
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

AGGLUTINATION ET DISSOLUTION DES GLOBULES ROUGES
PAR LE SÉRUM

PAR LE D^r JULES BORDET

DEUXIÈME MÉMOIRE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nous nous proposons d'exposer dans le présent travail quelques faits complémentaires de ceux que nous avons récemment fait connaître¹. Dans notre précédent Mémoire, nous avons énuméré les propriétés que possède le sérum de cobayes soumis à plusieurs injections de sang défibriné de lapin, et nous avons insisté sur les analogies étroites qui rapprochent un pareil sérum d'un sérum antimicrobien tel que le choléra-sérum.

Nous avons maintenant à nous demander en premier lieu si le pouvoir globulicide constitue le seul caractère des sérums antihématiques, et si ces liquides ne possèdent pas, en outre, certaines propriétés antitoxiques. Ensuite, nous chercherons à étendre la comparaison entre les sérums antihématiques et les sérums antimicrobiens. Nous rechercherons, par exemple, si un sérum antihématique, injecté à un animal neuf, confère aux humeurs de ce dernier un pouvoir globulicide ; on sait en effet que l'injection de choléra-sérum fait naître, dans le sérum de l'animal ainsi traité, un pouvoir vibrionicide intense.

1. Ces *Annales*, octobre 1898.

Mais la comparaison des divers sérums, relativement à leurs propriétés les plus importantes, doit se faire encore dans une autre direction. Il ne suffit pas de rapprocher les sérums anti-hématiques de ceux qui agissent sur les microbes. Il faut se demander en outre si les sérums neufs et les sérums spécifiques ont des caractères communs, s'il est possible de retrouver en germe, chez les animaux neufs, les propriétés actives qui se développeront et se spécialiseront à la suite des injections immunisantes. On sait que la faculté d'agglutiner et de détruire les globules rouges ou certains microbes existe déjà, à un certain degré, dans la plupart des sérums neufs. Les analogies qui se dessinent, à ce point de vue, doivent être précisées.

§ I. — PROPRIÉTÉS DES SÉRUMS ANTIHÉMATIQUES.

Le sérum actif de cobaye, dont nous nous sommes occupé dans notre précédent travail, et que fournissent les cobayes injectés à plusieurs reprises de sang défibriné de lapin, exerce sur les globules de lapin une influence nocive : il les agglutine, il en provoque la dissolution. Il *attaque* donc les éléments figurés identiques à ceux qu'on a injectés aux animaux producteurs du sérum.

Mais on peut supposer qu'un pareil sérum possède aussi, à côté de ces « propriétés d'attaque », des « propriétés de défense ».

Supposons, pour préciser, que nous injectons à un lapin neuf du sang de poule neuve. Le sérum de poule neuve est doué du pouvoir d'agglutiner et de dissoudre les globules de lapin. Il est désormais possible que le lapin « vacciné » contre ce sang de poule fournisse un sérum capable, non seulement d'attaquer avec énergie les hématies de poule, mais encore de défendre les globules de lapin contre l'action nocive que le sérum de poule peut exercer sur eux. En d'autres termes, à côté de la propriété antihématique comparable à la propriété antivibrionienne du choléra-sérum, nos sérums actifs pourraient être doués, dans une certaine mesure, de propriétés antitoxiques, la toxine étant représentée, dans l'exemple invoqué, par le sérum de poule. Nous avons donc à les étudier à deux points de vue, d'abord dans leur propriété antihématique, ensuite en ce qui concerne leur pouvoir antitoxique.

A. *Propriété antihématique.*

La propriété antihématique s'observe dans le sérum d'animaux qui ont été traités par des injections de sang défibriné provenant d'un animal appartenant à une espèce différente ¹.

Le sérum des lapins qui ont reçu dans le péritoine quelques injections de 10 c. c. de sang défibriné de poule, présente des propriétés très analogues à celles que nous avons reconnues au sérum de cobayes traités par le sang de lapin. Tandis que le sérum de lapin neuf n'exerce sur les hématies de poule qu'une influence agglutinante et dissolvante très faible, le sérum actif agglutine et dissout ces éléments avec une grande énergie. Néanmoins il n'a d'action que sur le protoplasme de l'hématie et en respecte le noyau.

Lorsqu'on examine au microscope un mélange de sang de poule et de sérum actif, on trouve que les globules sont réduits à leurs noyaux, qui sont agglomérés en amas plus ou moins compacts; il ne reste du protoplasme qu'un stroma délicat. Si l'on colore par l'éosine, puis par le bleu de méthylène, on ne distingue aucun contour protoplasmique; toute affinité du protoplasme pour l'éosine a disparu; par contre, les noyaux se colorent normalement en bleu. De telles lésions du globule ne caractérisent pas, exclusivement, l'action du sérum d'animaux traités; elles sont les mêmes lorsque les globules de poule sont mis en contact avec un sérum neuf doué d'une activité suffisante (tel est le sérum de chien). Seulement le sérum actif se distingue par l'intensité remarquable des propriétés qu'il peut, même à petite dose, manifester vis-à-vis des globules.

Le pouvoir dissolvant est détruit lorsque le sérum a été chauffé à 55°; il est reconstitué, si à un tel sérum, qui a été chauffé, on ajoute du sérum neuf de lapin ou de cobaye; ce sérum neuf contient, on le sait, de l'alexine ². Le sérum actif,

1. Des *lapins* qui ont reçu six injections intrapéritonéales de 10 c. c. de sang défibriné de *lapin* fournissent un sérum qui n'est doué d'aucune propriété particulière. Ceci est assez naturel. La production des matières actives qu'on trouve dans le sérum résulte évidemment d'une excitation cellulaire provoquée dans l'organisme traité, par l'introduction de substances étrangères que cet organisme ne possède pas normalement, qui sont capables de produire sur la cellule une certaine impression, en d'autres termes, qui peuvent amener un changement dans la constitution chimique ou physique de la cellule.

2. On peut remplacer le sérum neuf par de l'exsudat péritonéal extrait à un lapin neuf. Cet exsudat contient aussi, comme on sait, de l'alexine

chauffé à 55°, a gardé à la fois la propriété agglutinante et celle de constituer, avec l'alexine, un mélange doué d'un pouvoir globulicide intense. Nous n'insistons plus sur la signification de ces faits, ni sur les analogies — signalées dans notre article précédent — qui, sur ce point, unissent les sérums antimicrobiens aux sérums antihématiques.

Si l'on introduit, dans le péritoine d'un lapin neuf, du sang défibriné de poule, additionné de sérum actif exposé au préalable à la température de 55°, on constate la destruction rapide du protoplasme du globule, sous l'influence de l'alexine de l'exsudat péritonéal. Dans cet exsudat, on trouve les noyaux dépouillés de leur protoplasme, et qui résistent à l'action des humeurs, *in vivo*, comme ils lui résistaient *in vitro*. Ultérieurement, dans le péritoine, ces noyaux sont englobés par les macrophages.

On peut se demander si l'injection d'un sérum antihématique, provenant d'un animal traité, peut conférer, à un animal neuf de même espèce, une « immunité passive » analogue dans ses caractères à celle que procure l'injection de sérums antivibrioniens. On sait que le choléra-sérum donne lieu, lorsqu'on l'injecte à un animal neuf, à un phénomène remarquable : le sérum de l'animal injecté devient bactéricide pour le vibrion cholérique¹. Il faut donc déterminer si le sérum extrait à un lapin injecté au préalable du sérum actif vis-à-vis des globules de poule, est nettement globulicide pour ces hématies.

On retire un peu de sang à un lapin neuf; on obtient ainsi le sérum A. Immédiatement après cette saignée, on lui injecte 10 c. c. du sérum actif, sous la peau du dos. Le lendemain, on pratique une nouvelle saignée; on obtient ainsi le sérum B. On peut comparer la propriété globulicide du sérum A à celle du sérum B, et même mesurer assez exactement ces pouvoirs. On constate que le sérum B possède un pouvoir dissolvant bien accusé, tandis que le sérum A, qui est du sérum de lapin neuf, n'est doué que d'une très faible activité. Le sérum B présente en outre la propriété agglutinante, mais celle-ci n'y est représentée que faiblement; elle s'est transmise, mais en s'atténuant beaucoup, ce qu'il faut attribuer à la dilution qu'elle a subie en

1. Ce fait important a été constaté pour la première fois par MM. Fränkel et Sobernheim. (*Hygienische Rundschau*, 1894, n° 1.)

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

Pr. n° 145.

Vient de paraître :

MANUEL PRATIQUE
DE
L'ANALYSE DES ALCOOLS
ET DES SPIRITUEUX

PAR

Charles GIRARD
DIRECTEUR DU LABORATOIRE MUNICIPAL
DE PARIS

Lucien CUNIASSE
CHIMISTE EXPERT
DE LA VILLE DE PARIS

Un volume in-8° avec figures dans le texte, relié toile. 7 fr.

AVERTISSEMENT DES AUTEURS

Le nouveau manuel pratique de l'analyse des alcools et des spiritueux, que nous présentons aujourd'hui au public, forme un recueil dans lequel les nombreux procédés analytiques qui intéressent les produits alcooliques se trouvent condensés sous une forme brève et exacte, dans le but d'éviter les recherches au chimiste praticien.

Parmi les appareils et les méthodes de dosages que nous décrivons, un grand nombre ont été créés par nos devanciers, par nos collègues et par nous, au laboratoire municipal de Paris, sous la direction de MM. Ch. Girard, Dupré et Pabst. Les autres ont été vérifiés et pratiquement essayés, comparativement à nos procédés et aux méthodes anciennement connues.

Au début de ce livre, nous nous efforçons de divulguer les secrets de la dégustation; puis nous passons rapidement en revue les différentes méthodes et les appareils nombreux proposés pour

le dosage direct de l'alcool, en insistant sur ceux qui peuvent être dignes d'un certain crédit. La méthode de distillation est décrite avec soin ; nous indiquons les précautions à prendre, afin d'éviter les causes d'erreurs et d'unifier les résultats obtenus. De nombreuses tables très complètes accompagnent ces différents chapitres.

Les tables de comparaison, entre les étalons français et les alcoomètres étrangers usités dans les transactions commerciales, ont été vérifiées et sont exactement reproduites.

Les méthodes d'analyse des spiritueux sont exposées de façon à pouvoir être mises en œuvre pratiquement et presque sans raisonnement. Le procédé de dosage des différents sucres, qui présente un grand intérêt au sujet de la recherche des additions de glucose dans les liqueurs, est traité d'une façon suffisamment complète pour la pratique.

Les différentes méthodes d'analyse de l'alcool et de recherche de ses impuretés, ainsi que celle qui a été proposée, il y a quelques années, par M. Ch. Girard et ses collaborateurs, sont données avec les dernières modifications qui ont pu leur être apportées.

Des tables et des courbes inédites, dont la rigoureuse exactitude a été vérifiée par de nombreux essais, accompagnent nos méthodes afin de simplifier les calculs et d'éviter l'application des formules.

Les propriétés des corps organiques, dont il peut être question dans le texte, se trouvent condensées sous forme de tableau.

La partie qui traite de l'essai des alcools dénaturés et des méthylènes est particulièrement complète. Les méthodes sont exposées, telles qu'elles se pratiquent dans les laboratoires officiels, et avec un ensemble de détails opératoires qui en rendent l'application facile et immédiate.

Nous publions une bibliographie, aussi complète que possible, de l'alcool et de l'alcoolisme, et nous reproduisons textuellement les circulaires émises récemment par la Direction générale des contributions indirectes pour la réglementation fiscale des alcools et des spiritueux. Enfin, des tableaux représentant les résultats de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de spiritueux divers terminent cet ouvrage, et forment des documents nouveaux, utiles à consulter, ou susceptibles de servir de termes de comparaison.

Nous espérons que ce livre sera favorablement accueilli par nos nombreux collègues, par toutes les personnes qui s'intéressent à la question de l'alcool et de l'alcoolisme et qu'il viendra s'ajouter aux collections des aide-mémoire pratiques qui forment la bibliothèque de leurs laboratoires.

A LA MÊME LIBRAIRIE

- La rectification de l'alcool**, par Ernest SOREL, ancien ingénieur des manufactures de l'État, professeur au Conservatoire des Arts et Métiers. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- La Distillation**, par Ernest SOREL, 1 vol. in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- Les Appareils de distillation et de rectification**, par Emile BARDET, ingénieur des Arts et Manufactures. 1 vol. grand in-8°, avec figures 5 fr.
- Traité de la distillation des produits agricoles et industriels**, par MM. J. FRITSH, secrétaire de la rédaction du journal la *Distillerie française*, et E. GUILLEMIN, chimiste. 1 vol. in-8°, avec 80 figures dans le texte 8 fr.
- La Fabrication de l'alcool**, par M. J. Paul ROUX. Brochures in-8° : *La Production du rhum* : 3 fr. *Distillation des grains* : 5 fr. *Distillation du cidre* : 1 fr. 50. — *Distillation de la betterave* : 3 fr. — *Distillation des mélasses* : 3 fr. — *Distillation des vins* : 1 fr. 50.
- Fabrication des eaux-de-vie**, par Louis JACQUET, ingénieur des Arts et Manufactures. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- Examen sommaire des boissons falsifiées**, par A. HÉBERT, préparateur à la Faculté de médecine. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- Examen des aliments suspects**, par H. POLIN et H. LABIT, médecins-majors de l'armée. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- Analyse des vins**, par le D^r L. MAGNIER DE LA SOURCE, expert chimiste. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
- Manuel de vinification**, par L. ROUGIER, 3^e édition corrigée et considérablement augmentée. 1 vol. in-12 avec 45 figures 4 fr.
- Les Vins de luxe. Manuel pratique pour la préparation des vins de liqueurs et des vins mousseux**, par Victor SÉBASTIAN, chimiste œnologue, délégué du Ministère de l'Agriculture, avec une préface de M. FERNBACH, docteur ès sciences. 1 vol. in-8° 5 fr. 50
- Le Laboratoire du Brasseur**, par M. Louis MARX, malteur à Marseille. *Ouvrage couronné par la Société d'Encouragement pour l'Industrie nationale*, 3^e édition. 1 vol. in-8. 12 fr.
- La Bière**, par M. L. LINDET, professeur à l'Institut agronomique. 1 vol. in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. 2 fr. 50
-

Vient de paraître :

Cent vingt Exercices de Chimie Pratique

DÉCRITS D'APRÈS LES TEXTES ORIGINAUX ET LES NOTES DE LABORATOIRE
ET CHOISIS POUR FORMER LES CHIMISTES

PAR

Armand GAUTIER

Membre de l'Institut, Professeur à la Faculté de médecine de Paris.

ET

J. ALBAHARY

Doct. Phil. des laboratoires de E. FISCHER et A. GAUTIER.

1 volume in-16 avec figures dans le texte, relié toile. 3 fr.

Ce petit ouvrage a pour but de former au métier de chimiste ceux qui ont déjà quelque habitude du laboratoire. Il consiste en une suite de préparations, ou exercices, empruntés aux diverses branches de la science. Mais ces exercices, toujours décrits avec détail d'après les textes des auteurs originaux ou la pratique du laboratoire, sont suffisamment précisés pour que l'élève puisse les exécuter pour ainsi dire sans maître, et leur choix est tel qu'il permet d'aborder successivement les sujets les plus intéressants et les plus délicats de la chimie minérale, organique et biologique.

Toutefois, on aurait tort de chercher dans ce petit volume un *Traité de manipulations*, et moins encore une série d'exercices élémentaires destinés aux tout à faits débutants. Les préparations décrites visent généralement l'obtention de corps purs ou difficiles à produire ; elles sont donc quelquefois assez compliquées, et la facilité relative de leur exécution, aussi bien que le profit qui en résulte pour l'élève, ne peut résulter que du choix des sujets, de leur graduation et des détails où les auteurs entrent pour assurer le succès des préparations.

Ce livre n'a pas, d'ailleurs, pour seul objectif de faire entrer l'élève dans le secret de la fabrication pratique des corps ; il tend aussi à faire saisir à l'esprit leurs relations théoriques. C'est à la fois un guide de laboratoire et un éducateur méthodique. En le suivant pas à pas, un bon étudiant peut facilement, en une année, se former comme chimiste praticien, et prendre une idée très complète des principales synthèses de la chimie, des méthodes qu'elle met en œuvre, et de l'analyse immédiate.

se répandant dans les humeurs du lapin neuf. En effet, le sérum actif employé agglutine avec beaucoup d'énergie trois ou quatre parties de sang de lapin. Mais il ne produit plus, à aucune dose, d'agglutination rapidement constatable lorsqu'il a été dilué, au préalable, dans 20 ou 25 parties de solution de NaCl à 0,7 0/0¹.

Nous avons signalé antérieurement le fait que les agglutinines, injectées sous la peau d'un animal neuf, passent dans le sang avec rapidité².

L'idée la plus naturelle qui découle de cette expérience est que les substances actives du sérum injecté sous la peau se diluent simplement dans les humeurs de l'animal neuf. Il s'ensuit que le sérum de cet animal doit acquérir, — d'une manière moins accusée bien entendu, — toutes les propriétés caractéristiques du sérum actif injecté. C'est en effet ce qui arrive. Chauffé à 55°, ce sérum B perd sa propriété dissolvante, mais il la récupère par l'addition d'un peu de sérum A (sérum neuf). Il est à peine nécessaire de dire que de telles expériences, comme toutes celles que nous relatons ici, comportent des témoins bien comparables et un dosage précis. On fait, par exemple, les mélanges suivants :

a) Mélange de : une partie de sang défibriné de poule ; quatre parties de sérum A chauffé au préalable (pendant une demi-heure), à la température de 55° ; trois parties de sérum A, non chauffé. — Ce premier mélange est le témoin.

b) Mélange de : une partie de sang défibriné de poule ; quatre parties de sérum B, chauffé au préalable (pendant une demi-heure) à la température de 55° ; trois parties de sérum A, non chauffé.

Des gouttes de chaque mélange sont suspendues en lames creuses. On constate que les hématies restent intactes dans le mélange a). Le lendemain, on y trouve quelques noyaux libres, mais les hématies détruites ne sont qu'en faible minorité (le sérum de lapin neuf possède une activité globulicide très peu intense). Dans le mélange b), la destruction des hématies se fait très rapidement ; au bout d'une heure, tous les noyaux sont libres.

Il faut avoir soin, dans ces expériences ayant trait au pouvoir

1. Dans de telles conditions, l'agglutination ne devient visible qu'au bout d'un temps assez prolongé. Il en est de même pour ce qui concerne le sérum B. Dans ces cas où l'agglutination est lente à se produire, il est nécessaire, pour la constater, d'opérer avec des sérums chauffés au préalable à 55° et dont le pouvoir dissolvant n'existe plus.

2. Mode d'action des sérums préventifs. Ces *Annales*, avril 1896. — Les agglutinines injectées sous la peau passent aussi dans l'exsudat péritonéal, mais en quantité plus faible que dans le sang (expérience faite au moyen de choléra-sérum).

dissolvant, d'exposer les divers liquides que l'on compare entre eux, à des températures entièrement identiques. La dissolution des hématies est en effet très accélérée par la chaleur (il en est de même, comme on sait, de la transformation granuleuse du vibron cholérique).

On n'a aucune raison de supposer — l'expérience ci-dessus relatée le montre clairement — que l'injection de sérum actif aux animaux neufs aurait pour conséquence la sécrétion d'une alexine dissolvante spéciale, différente de celle qu'on trouve dans le sérum neuf. *Tout se passe comme si les substances injectées se diluaient simplement dans les humeurs de l'animal.* On peut faire, avec le sérum de l'animal injecté, les expériences réalisables avec le sérum actif lui-même.

En conséquence, si l'on admet que les substances propres du sérum actif ne font que se diluer dans les humeurs, sans subir aucune transformation quelconque, lorsqu'on les injecte aux animaux neufs, on doit admettre aussi que l'on peut, en mélangeant à du sérum A (sérum extrait au lapin neuf avant l'injection de sérum actif) une certaine quantité du sérum actif employé dans l'expérience, obtenir un liquide ayant exactement l'activité du sérum B (sérum extrait à l'animal après l'injection de sérum actif). On devra admettre, en outre, que pour obtenir une mixture possédant l'activité du sérum B, il faudra mêler le sérum actif au sérum A, en proportion comparable au rapport du volume de sérum actif injecté au volume des humeurs de l'organisme.

C'est en effet ce qui arrive. Dans l'expérience précédente, le sérum B (extrait à un lapin d'environ 2,000 grammes, et qui a reçu une injection de 10 c. c. de sérum actif) possède une activité très comparable à celle d'une dilution de une partie de sérum actif dans environ 20 parties de sérum A.

On peut faire cette expérience d'une manière plus précise, que voici. On injecte du sérum antihématique à un animal neuf. Par exemple, à un cobaye neuf, pesant 600 grammes, on injecte sous la peau 3 c. c. de sérum de cobaye actif vis-à-vis des globules de lapin. On a obtenu, au préalable, le sérum A en saignant l'animal avant l'injection; on obtient le sérum B en saignant le cobaye 24 heures après l'injection. On fait un mélange, nous l'appellerons sérum C, de une partie de sérum actif (identique à celui qu'on a injecté) et de 19 parties de sérum A. On chauffe ce mélange pendant une demi-heure à 55°, ainsi que le sérum B; on élimine ainsi l'alexine de ces deux liquides (ceux-ci pourraient différer quelque peu entre eux par

leur teneur en alexine, ce qui vicierait l'expérience). On compare alors les sérums B et C dans leur propriété de constituer, avec le sérum neuf A, qui contient de l'alexine, un mélange dissolvant pour les globules rouges de lapin. On peut, en effet, mesurer l'activité de B et de C, en recherchant à quelle dose ils doivent agir sur des quantités déterminées de globules, pour que ceux-ci se dissolvent (dans le même temps à peu près) sous l'influence d'un volume donné de sérum neuf A. On trouve que B est légèrement moins actif que C. En conséquence, tout se passe comme si le sérum actif, injecté sous la peau d'un cobaye de 600 grammes, se diluait, en se répandant dans l'organisme, dans un volume d'humeurs légèrement supérieur à 60 c. c. Cette dilution est à peu près celle qui doit se produire dans la réalité.

Les divers faits que nous avons relevés jusqu'ici, l'identité de l'action exercée par les sérums sur les globules, *in vivo* d'une part, *in vitro* de l'autre, les expériences que nous venons de citer, nous permettent d'arriver à une conclusion entièrement identique à celle que nous avons émise antérieurement à propos des sérums antimicrobiens. Les sérums antihématiques ne possèdent pas de substance globulicide qui leur soit particulière; la substance globulicide (l'alexine), destructible à 55°, est répandue dans les sérums neufs comme dans les sérums d'animaux traités par le sang défibriné. Peu active dans le sérum neuf, elle agit énergiquement dans le sérum d'animaux traités, parce qu'elle se trouve alors mélangée à une substance spéciale, propre à ce sérum actif, résistant au chauffage à 55-60°, et qui favorise l'action de l'alexine. Le pouvoir globulicide intense, qui apparaît dans le sérum d'un animal neuf, à la suite de l'injection de sérum actif, est dû, non pas à une réaction de l'animal, ni à une transformation quelconque des substances injectées, mais simplement à la rencontre, au sein de l'organisme, des deux substances nécessaires à la constitution d'un pouvoir globulicide intense: l'organisme possédait déjà l'une de ces substances, l'alexine; l'autre, la substance spécifique, qui caractérise le sérum actif, lui est donnée par l'injection. Cette rencontre des deux substances, qui peut s'effectuer dans l'organisme, peut être réalisée aussi *in vitro* par le simple mélange de sérum neuf et de sérum actif intact ou préalablement chauffé à 55° ou 60°.

Spécificité du sérum de lapin actif vis-à-vis du sang de poule.

1. Nous nous bornons ici à reproduire exactement, en l'appliquant aux sérums antihématiques, la manière de voir que nous avons exprimée en 1895, pour les sérums antimicrobiens. (Ces *Annales*, juin 1895.)

— Nous n'avons pas fait un grand nombre d'expériences sur ce sujet, mais il paraît certain que ce sérum possède le caractère de la spécificité dans la même mesure, selon toute apparence, que les sérums antimicrobiens. Ce sérum de lapin n'a aucune action sur les globules de lapin, ce qui est assez naturel, mais il reste sans effet également sur les globules de cobaye; dans son action vis-à-vis de ces derniers, il n'est pas supérieur au sérum de lapin neuf; il ne s'en distingue guère non plus lorsqu'on le met en contact avec des hématies de pigeon, d'homme ou de souris. Pour aucun de ces globules, on ne constate l'agglutination et la dissolution énergiques, qui sont si frappantes lorsqu'on met en jeu les globules de poule.

Fixation par les globules des substances propres au sérum antihématique. — Les globules sensibles à l'influence d'un sérum antihématique déterminé fixent les substances actives de ce sérum. Nous avons déjà parlé de ce fait dans un travail récent; nous avons signalé aussi que les microbes absorbent de même toutes les matières actives des sérums antimicrobiens. Les globules, qui ne ressentent pas l'influence d'un sérum, n'en absorbent pas les substances actives. Ceci est vrai aussi pour ce qui concerne les sérums neufs. Par exemple, si l'on met en contact du sérum de poule neuve avec des globules de lapin, ceux-ci s'agglutinent énergiquement; le liquide décanté est dépouillé de propriétés agglutinantes et n'agit plus sur de nouveaux globules de lapin. Mais si l'on met en contact du sérum de poule avec des globules que ce sérum n'agglutine que très faiblement (globules de cobaye) le liquide décanté conserve tout son pouvoir vis-à-vis de globules bien agglutinables.

Voici, pour ce qui concerne l'absorption des principes actifs d'un sérum antihématique, la technique de l'expérience :

On se sert de sérum actif chauffé préalablement à 55° pendant une demi-heure, et qui, par conséquent, n'est plus dissolvant. On met dans des tubes les mélanges suivants :

A) Mélange de 3 c. c. de sérum de lapin neuf et de 1/2 c. c. de sérum actif de cobaye.

B) Mélange de 3 c. c. de sang défibriné de lapin neuf et de 1/2 c. c. de sérum actif de cobaye.

1. Ces *Annales*, mars 1899. Le mécanisme de l'agglutination.

Le premier tube sert de témoin. Les deux tubes contiennent des quantités de sérum actives égales et semblablement diluées. Seulement le second tube contient des globules, tandis que le premier n'en contient pas. On centrifuge, on décante. Les liquides clairs obtenus sont éprouvés d'abord au point de vue de leur pouvoir agglutinant. On constate que le premier liquide (A), qui n'a pas été au contact de globules, agglutine très énergiquement les globules de lapin; l'autre (B) n'agglutine pas. On recherche ensuite si ces deux liquides sont également susceptibles de constituer, avec l'alexine d'un sérum neuf, des mélanges dissolvants pour les globules. On prépare les mélanges :

a) Mélange de une partie de sang défibriné de lapin neuf, une partie du liquide A, cinq parties de sérum frais de cobaye neuf;

b) Mélange de une partie de sang défibriné de lapin neuf, une partie de liquide B, cinq parties de sérum frais de cobaye neuf.

On constate que la dissolution se fait très rapidement dans le mélange a) et que les globules restent intacts dans le mélange b).

On voit que les globules rouges fixent avidement les substances actives des sérums antihématiques. Aussi l'impression produite sur eux par ces substances (et qui amènent leur agglutination et la sensibilisation à l'alexine) est profonde et ne s'efface pas si on soumet ces globules à des lavages répétés, si on tente d'éliminer ainsi les substances actives qu'ils ont absorbées. Ces lavages s'opèrent très facilement. On verse dans un tube à essais quelques gouttes d'eau physiologique chargée de nombreux globules⁴; on ajoute une petite quantité de sérum actif qu'on a, au préalable, chauffé à 55°, pour éliminer l'action dissolvante. On remplit le tube d'eau physiologique. On agite, puis l'on centrifuge; on décante le liquide clair en ne laissant que le dépôt de globules; on ajoute de nouveau de l'eau physiologique, et l'on répète les mêmes opérations; on obtient finalement un dépôt de globules bien lavés.

Ceux-ci, mis en contact avec du sérum neuf, se dissolvent aussi rapidement que des globules traités par la même dose de sérum actif, mais qui n'ont été soumis à aucun lavage.

De tels faits semblent prouver nettement que cette substance particulière, résistante à la chaleur, propre au sérum des vaccinés, et qui permet l'action énergique de l'alexine dissolvante, *porte son action sur les globules eux-mêmes*, pour les impressionner directement et les sensibiliser à l'action de l'alexine. On aurait pu

4. Dans cette expérience, les globules ont été eux-mêmes lavés au préalable; ce lavage avait pour but d'enlever le sérum qui accompagne les globules dans le sang défibriné; il était utile, dans cette expérience, de ne faire intervenir aucune trace d'alexine.

supposer aussi que cette substance spéciale agit, non pas sur les globules, mais directement sur l'alexine pour la rendre plus énergique. Cette dernière hypothèse n'est pas d'accord avec les faits; en outre, elle expliquerait d'une manière moins satisfaisante l'existence de la spécificité. Il paraît démontré, par l'expérience ci-dessus, que si l'on fait un mélange de globules, de sérum actif qui a été chauffé à 55°, et de sérum neuf, il ne se passe aucune réaction dans la partie liquide du mélange, entre l'alexine et la substance spéciale du sérum actif; cette dernière en effet se sépare rapidement du liquide pour se fixer avec énergie sur les éléments figurés; ceux-ci deviennent alors sensibles à l'action de l'alexine, qu'on peut d'ailleurs n'ajouter qu'ultérieurement, alors que toute la dose de substance sensibilisatrice présente s'est combinée aux globules. — Des expériences semblables peuvent être faites avec les microbes (vibrions cholériques) et les sérums antimicrobiens¹. Nous admettons donc, comme suffisamment démontrée, l'idée déjà acceptée auparavant par nous, *que les sérums spécifiques contiennent une substance sensibilisatrice, rendant le globule ou le microbe susceptibles d'être attaqués par l'alexine.*

Nous n'avons jusqu'ici relevé que des analogies très étroites entre les propriétés manifestées par un sérum de cobaye actif vis-à-vis du sang de lapin, et celles que présente le sérum de lapin actif vis-à-vis du sang de poule. Il existe cependant entre ces sérums une différence qui mérite d'être signalée.

Comme nous l'avons dit dans notre notice précédente, si l'on fait agir, sur du sang défibriné de lapin, du sérum actif de cobaye chauffé à 55°, on constate que les globules sont partiellement atteints et que le liquide prend une teinte rouge bien visible. Cela tient, ainsi que nous l'avons fait remarquer, à ce que les globules sont légèrement attaqués par la petite dose d'alexine (de lapin), qui se trouve, à côté des globules, dans le sang défibriné. En effet, si l'on traite par le sérum actif chauffé à 55°, non plus du sang défibriné ordinaire, mais des globules préalablement lavés à l'eau physiologique (et centrifugés ensuite), on constate qu'il ne se produit aucune dissolution : l'alexine a été

1. Des vibrions cholériques, impressionnés par le choléra-sérum, puis lavés soigneusement, se transforment en granules sous l'action de sérum neuf, ou lorsqu'on les introduit dans le péritoine d'un cobaye neuf.

éliminée par le lavage. D'autre part, si à ces globules de lapin, lavés et impressionnés, on ajoute une dose suffisante de sérum de lapin neuf, la dissolution se fait avec rapidité et complètement. Donc, des globules de lapin, sous l'influence de la substance sensibilisatrice, deviennent accessibles à l'action de l'alexine du lapin lui-même. On s'attend, par analogie, à ce que les globules de poule, additionnés de sérum actif chauffé au préalable à 55° (sérum provenant d'un lapin injecté de sang de poule), se dissolvent aussi dans le sérum neuf de poule. Or cette dissolution ne se produit pas. Malgré l'influence de la substance sensibilisatrice, les globules de poule ne sont donc pas devenus sensibles à l'alexine de la poule elle-même.

Ce fait montre assez clairement que les alexines, provenant d'animaux d'espèces différentes, ne sont pas complètement identiques. Leurs caractères les plus importants leur sont communs; elles agissent toutes à peu près de la même façon sur un même microbe, mais elles se montrent différentes par rapport à leur action sur les hématies. Cette notion s'imposait d'ailleurs, *à priori*, car l'étude de l'action des sérums neufs sur les globules montre que les hématies d'un animal ne sont point attaquées par l'alexine provenant du même animal, tandis qu'elles sont sensibles à l'action altérante d'alexines élaborées par des organismes différents.

On pourrait rapprocher, si une comparaison un peu grossière était permise, la modification apportée par la substance sensibilisatrice sur le globule, de celle qui consisterait à changer la structure d'une serrure, de façon à y permettre l'introduction facile d'une ou de plusieurs clefs qui n'y entraient pas auparavant ou n'y pénétraient qu'avec difficulté. Deux clefs suffisamment semblables entreraient dès lors indifféremment. De même, les alexines de cobaye ou de lapin « entrent » l'une et l'autre, dans le globule de lapin et dans le globule de poule, lorsque ces globules sont préalablement sensibilisés. Au contraire, l'alexine de poule, étant vraisemblablement trop différente des alexines de cobaye ou de lapin, « n'entre » pas dans le globule de poule préalablement sensibilisé par le sérum actif. Peut-être « l'entrée » (ou si l'on veut, la mise en jeu efficace) de l'alexine dépend-elle non seulement de la nature de l'alexine, mais aussi de la nature, de la *provenance spéciale* de la substance sensibilisa-

trice. Il y a là une série d'essais à faire, et faute de documents suffisants, nous nous bornons actuellement à signaler dans quel sens le mode d'action de ces diverses matières pourrait être utilement approfondi.

Action de la chaleur sur les substances actives du sérum. — Si l'on chauffe à 55° du sérum de lapin actif vis-à-vis des globules de poule, les propriétés agglutinante et sensibilisatrice persistent, ainsi qu'on l'a vu, tandis que la fonction dissolvante est supprimée.

Après un chauffage d'une demi-heure à 60°,5, les pouvoirs agglutinant et sensibilisateur sont intacts; le chauffage à 65° fait baisser légèrement le pouvoir agglutinant, lequel devient très faible après un chauffage pendant le même temps à 70°; ce pouvoir est alors presque imperceptible. Nous devons faire ici la remarque que le même sérum, non chauffé, n'agglutine visiblement à aucune dose, lorsqu'il a été préalablement dilué dans environ 20 parties d'eau physiologique; ceci nous montre que pour agir sur les globules, l'agglutinine doit se trouver à un certain état de concentration; on ne doit pas conclure, de l'absence du phénomène, à l'absence complète de la substance active. La propriété sensibilisatrice se manifeste encore fortement dans le sérum chauffé à 70° (de même que dans le sérum dilué de 20 parties d'eau). C'est ainsi que une partie de sang défibriné mêlée à une grande dose, par exemple à 2 parties du sérum chauffé à 70°, et à 4 parties de sérum de lapin neuf, présente rapidement le phénomène de la dissolution. Mais si l'on fait agir sur des quantités égales de sang défibriné, additionné de sérum neuf, des doses *relativement faibles*, d'une part de sérum actif chauffé à 60°, d'autre part du même sérum chauffé à 70°, on trouve que la dissolution se fait plus lentement dans le dernier mélange; la propriété sensibilisatrice du sérum a été diminuée par le fait du chauffage à 70°. Elle est très atténuée, sans avoir complètement disparu, après un chauffage de 1/2 heure à la température de 75°.

Faisons observer que si l'on mélange du sang défibriné de poule avec du sérum neuf et du sérum actif chauffé à 70°, on peut obtenir la dissolution sans observer d'agglutination préalable; les globules se montrent bientôt réduits à des noyaux

isolés. L'agglutinine est sinon détruite, au moins devenue trop faible ou trop peu abondante; elle ne peut plus exercer effectivement son influence et provoquer la formation d'amas; néanmoins, la sensibilisation a pu encore s'opérer.

Propriété précipitante. — A côté de la propriété antihématique du sérum, nous devons signaler la propriété que présente le sérum de lapin actif vis-à-vis des globules de poule, de faire naître un précipité dans le sérum neuf de ce dernier animal. Nous avons déjà abordé cette question dans un mémoire précédent ¹, et nous avons rappelé à ce propos les recherches de M. Tchistovitch, à qui l'on doit les premières constatations d'un pareil phénomène. Quand on mélange les deux sérums, il se fait rapidement un trouble d'abord léger, qui augmente bientôt et finit par se condenser en flocons. C'est dans un mélange de une ou deux parties de sérum de poule avec huit ou neuf parties de sérum actif, que le précipité est le plus abondant.

Si, au lieu de traiter des lapins par du sang de poule, on fait l'inverse, c'est-à-dire si l'on traite des poules par du sang de lapin, on constate que le sérum de ces poules précipite le sérum neuf de lapin. Le phénomène de précipitation ne se retrouve néanmoins pas régulièrement dans tous les cas soumis à l'examen; le sérum de cobayes traités par le sang de lapin ne précipite pas le sérum de ce dernier animal. Les sérums d'animaux neufs différents ne donnent jamais de précipité lorsqu'on les mélange.

B. — *Propriété antitoxique.*

Il était vraisemblable qu'on pût arriver à produire des sérums doués de pouvoir antitoxique, capables de s'opposer à l'action destructive exercée sur les globules rouges par certains sérums. En effet, MM. Camus et Gley, Kossel ont montré que des animaux immunisés contre le sérum d'anguille élaborent des substances capables de protéger leurs globules contre l'action dissolvante de ce sérum toxique.

1. Mécanisme de l'agglutination. Ces *Annales*, mars 1899. Nous ne reviendrons pas ici sur la signification qui nous paraît devoir être attribuée à ce phénomène. Nous avons déjà mentionné l'action de la chaleur sur ces propriétés de précipitation, et recherché jusqu'à quel point ces propriétés sont spécifiques. Rappelons que le sérum dont il s'agit précipite aussi le sérum neuf de pigeon.

Pour que les expériences puissent conduire à des résultats aisément constatables, il faut évidemment que la « toxine » employée soit puissante. Il faut donc injecter à des animaux d'espèce A, du sérum (ou du sang défibriné) qui provient d'une espèce animale B, et qui est capable d'agglutiner et de dissoudre, avec beaucoup d'énergie, les globules rouges de l'animal appartenant à l'espèce A. Les lapins et le sang de poule satisfont aux conditions exigées : l'action agglutinante et dissolvante du sérum de poule neuve sur les hématies de lapin est en effet fort énergique. Au contraire, la propriété antihématique du sérum de lapin neuf vis-à-vis des globules de cobaye n'existe qu'à un degré relativement faible; le sérum de cobaye « vacciné » contre du sang de lapin ne convient guère, en conséquence, à l'étude de la propriété antitoxique (antihématotoxique).

Le sérum de poule neuve agglutine avec beaucoup d'énergie partie égale de sang défibriné de lapin. En outre, trois ou quatre parties de ce sérum, ajoutées à une partie de ce sang, dissolvent rapidement les globules. Des lapins, qui ont reçu dans le péritoine trois injections de 10 c. c. de sang de poule, présentent une fonction antitoxique du sérum, qui, à la vérité, n'est pas extrêmement intense. On peut la mettre en évidence en faisant des mélanges, d'une part, de sang de lapin neuf, de sérum de poule (frais), et de sérum actif de lapin; — d'autre part, de sang de lapin neuf, de sérum de poule (frais) et de sérum de lapin neuf. Ce second mélange sert de témoin. Voici, par exemple, la constitution exacte de pareils mélanges :

a) Une partie sang de lapin neuf; trois parties sérum de poule; dix parties sérum actif de lapin;

b) Une partie sang de lapin neuf; trois parties de sérum de poule; dix parties de sérum neuf de lapin.

Dans le mélange *d*, les globules forment très rapidement de très gros amas compacts, lesquels, au bout de 2 à 3 heures, se dissolvent. Dans le mélange *a*, les globules restent indéfiniment intacts, et l'agglutination qu'on y observe est très faible; les amas sont fins et petits.

Outre le pouvoir de s'opposer à la dissolution des globules, nous reconnaissons au sérum actif un réel pouvoir anti-agglutinant.

Le mélange témoin montre que le sérum de lapin neuf ne possède point de propriétés antitoxiques.

Si l'on cherche à diminuer beaucoup la dose de sérum actif, ou à augmenter la dose de sérum dissolvant de poule, l'effet antitoxique n'est plus observable. Ainsi, dans un mélange constitué de une partie de sang de lapin, trois parties de sérum actif, six parties de sérum de poule, les globules se dissolvent sans retard appréciable.

Pour constater nettement, non pas l'action « antidissolvante », mais l'influence de l'« antiagglutinine », il convient d'employer du sérum de poule qui a été chauffé à 55°, et qui, on le sait, n'est plus dissolvant, mais agglutine avec une énergie très grande volume égal de sang de lapin. On prépare par exemple les mélanges :

a) Sang défibriné, une partie; sérum actif, dix parties; on ajoute une partie de sérum de poule;

b) Sang défibriné, une partie; sérum neuf (de lapin), dix parties; on ajoute une partie de sérum de poule.

L'agglutination est très rapide et extrêmement forte dans le mélange b), elle reste nulle ou extrêmement faible dans le mélange a).

Chaque fois qu'on mélange du sérum actif à du sérum de poule, il se forme un précipité. On pourrait supposer que le sérum actif ne contient pas, à proprement parler, une substance antitoxique et admettre que le précipité entraîne, au moment de sa formation, les matières nocives du sérum de poule et rend ainsi ce sérum inactif. Cette objection n'est pas fondée; en effet, le sérum actif de lapin, chauffé à 70°, a perdu la propriété de faire naître un précipité dans le sérum de poule, mais il manifeste encore ses propriétés antiagglutinantes. En outre, il a gardé le pouvoir de s'opposer à la dissolution des globules par l'alexine de poule.

Ceci nous montre que la substance, qui s'oppose à la dissolution par l'alexine, est une substance *toute différente des alexines elles-mêmes*.

Le sérum de cobayes « vaccinés » contre le sang de lapin manifeste aussi des propriétés antitoxiques, mais ces propriétés sont très faibles.

§ II. ANALOGIES ENTRE LES SÉRUMS SPÉCIFIQUES ET LES SÉRUMS NORMAUX. ANALOGIES ENTRE LES SUBSTANCES ACTIVES SUR LES MICROBES ET CELLES QUI AGISSENT SUR LES GLOBULES.

On sait que différentes propriétés des sérums spécifiques se retrouvent aussi, à un degré faible, il est vrai, dans les sérums normaux. Ceux-ci peuvent manifester en effet des actions agglutinantes, des actions dissolvantes, soit sur les microbes, soit sur les globules. Comme on ne peut se défendre de l'idée bien naturelle que les propriétés acquises par les organismes, à la suite de l'immunisation, ne sont que le perfectionnement, l'exaltation de facultés préexistantes, il n'est pas sans intérêt de rechercher si les substances actives qui existent, d'une part dans les sérums de vaccinés, d'autre part dans les sérums neufs, possèdent des caractères communs et doivent être considérées comme étant proches parentes. Il est utile de comparer, par exemple, les propriétés antihématiques, si fortement accusées dans le sérum des animaux traités par le sang défibriné, avec celles qu'on trouve dans les sérums neufs et qui sont de même ordre.

La propriété d'agglutiner et de dissoudre les hématies est très communément répandue parmi les sérums neufs.

On le sait, ceux-ci n'agissent que sur des globules provenant d'animaux différents de ceux qui fournissent le sérum considéré. Voici quelques renseignements sur l'activité agglutinante de quelques sérums neufs vis-à-vis de variétés diverses de globules rouges (on mélange, en général, une partie de sang défibriné à trois ou quatre parties de sérum).

Le sérum de cobaye agglutine assez faiblement divers globules, tels que ceux de lapin, de poule, un peu plus fortement ceux de rat.

Le sérum de lapin n'a également que des propriétés agglutinantes faibles (par exemple sur les globules de cobaye, d'homme, de poule, de rat).

Le sérum de poule manifeste un pouvoir agglutinant très énergique vis-à-vis des globules de chien, de rat et surtout de lapin; au contraire, son action agglutinante sur les globules de cobaye est très faible. Il agglutine assez fortement les globules de pigeon.

Le sérum de pigeon ne manifeste que des propriétés aggluti-

nantes extrêmement faibles (globules de poule, lapin, homme). Son action agglutinante sur les microbes est aussi très peu intense.

Le sérum de chien agglutine assez fortement les globules de lapin, de rat, faiblement ceux de cobaye, de poule.

Le sérum de rat agglutine faiblement les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de chèvre agglutine nettement les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de cheval agglutine nettement les globules de cobaye, de lapin, de poule, et très énergiquement les globules de rat.

Quant au pouvoir dissolvant des sérums sur les globules, il est toujours exercé par l'alexine, cette substance destructible à 55°. C'est une règle générale, et qui s'applique aux divers sérums, que le pouvoir de détruire les globules rouges disparaît par le chauffage à 55°¹.

L'action destructive la plus puissante que nous ayons constatée en étudiant les sérums neufs, est celle qu'exerce le sérum de poule sur les globules de lapin. Une partie de sang défibriné de lapin se dissout rapidement dans deux ou trois parties de sérum de poule. L'action destructive de ce sérum vis-à-vis des globules de rat est très nette également; elle est très faible vis-à-vis des globules de cobaye.

Le sérum de chien dissout très énergiquement aussi les globules de poule (il respecte, bien entendu, le noyau); il atteint aussi très bien les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de cobaye, de lapin, exercent sur les globules de poule, d'homme, une action destructive faible. Le sérum de cobaye n'agit sur les globules de lapin que lentement et à forte dose. Le sérum de lapin est plus actif vis-à-vis des globules de cobaye; il est à peu près complètement dénué d'action vis-à-vis des globules de rat.

Il faut remarquer, à propos de l'ensemble de ces constatations, que la puissance agglutinante ou dissolvante de divers échantil-

1. Il existe cependant une exception, mais elle n'est qu'apparente. Les globules de chien se dissolvent encore dans des sérums qui ont été chauffés à 55°. Mais ces globules se dissolvent aussi dans le sérum provenant du même animal. Il s'agit là, non point d'une action alexique, mais d'une fragilité toute spéciale et exceptionnelle, qui caractérise les globules rouges de chien.

lons d'un même sérum neuf n'est pas toujours la même; il y a des différences individuelles qui peuvent être assez marquées.

L'examen des résultats ci-dessus consignés ne permet guère de poser des règles quelque peu générales. On n'est guère autorisé, par exemple, à classer nettement les globules en groupes, suivant leur sensibilité aux actions agglutinantes ou dissolvantes.

Des globules d'une certaine espèce seront très facilement agglutinés par un sérum neuf, et résisteront à l'action d'un autre sérum. De même, on ne peut pas admettre d'une manière absolue, que si un sérum donné agglutine très énergiquement une certaine espèce de globules, il se montrera très actif également vis-à-vis des autres variétés d'hématies. Par exemple, le sérum de poule, qui influence si vivement les globules de lapin, de chien, de rat, n'impressionne presque pas les globules de cobaye. On ne peut davantage émettre, comme règle générale, qu'un sérum capable de dissoudre très activement des globules d'une certaine espèce, les agglutine nécessairement avec une grande énergie. S'il est vrai, par exemple, que le sérum de poule dissout très aisément les globules de lapin, et les agglutine fortement, on trouve, d'autre part, que le sérum de chien n'agglutine les globules de poule que très faiblement, alors qu'il les détruit avec beaucoup d'activité. Il faut admettre que, dans ces réactions des sérums sur les globules, deux facteurs tout à fait distincts entrent en jeu. C'est, d'une part, la richesse plus ou moins grande du sérum en substances actives. C'est, d'autre part, la sensibilité *spéciale* du globule considéré vis-à-vis des matières propres au sérum employé dans l'expérience, les globules pouvant être très sensibles à l'influence des substances actives de ce sérum, tout en étant beaucoup plus réfractaires à l'action de celles qui existent dans un sérum neuf différent. Malgré les ressemblances qu'elles présentent dans leur mode d'action, les agglutinines, provenant de sérums neufs différents, ne sont pas identiques; il doit exister entre elles des différences de constitution chimique, probablement assez faibles, expliquant la diversité de leur action vis-à-vis d'une même race de globules. La même observation s'applique aussi aux alexines fournies par des animaux d'espèce différente. Corrélativement, les globules de différentes espèces sont différents de constitution; ils ont tous leur

façon spéciale de réagir vis-à-vis d'une même alexine ou d'une même agglutinine.

En outre, nous avons décrit, dans notre mémoire sur le mécanisme de l'agglutination, une expérience tendant à faire admettre qu'un même sérum neuf contient plusieurs agglutinines différentes.

*
* *

Il convient de rechercher jusqu'à quel point les substances douées de propriétés comparables se ressemblent dans les divers sérums où elles se rencontrent. Il faut donc comparer, par exemple, les agglutinines des sérums neufs à celles des sérums de vaccinés, les agglutinines et substances sensibilisatrices antihématiques à leurs correspondantes antimicrobiennes.

Nous avons déjà longuement insisté sur ce fait que, pour ce qui concerne les alexines, les sérums neufs ne se distinguent pas des sérums de vaccinés, qu'il s'agisse de sérums antimicrobiens ou de sérums antihématiques.

D'autre part, les alexines qui agissent sur les globules paraissent entièrement identiques à celles qui agissent sur les microbes. De même que le pouvoir d'altérer les globules rouges, le pouvoir de transformer les vibrions en granules est très répandu dans les sérums de provenances les plus diverses. Les vibrions, surtout s'ils sont sensibilisés par une trace de choléra-sérum, se transforment facilement en granules lorsqu'on les met en contact avec les sérums neufs de lapin, de cobaye, de chèvre, de poule, de chien, de rat, de pigeon; il n'existe entre ces sérums que des différences peu importantes dans l'intensité de leur action ¹. Ces sérums perdent tous leur activité lorsqu'ils sont portés à une température d'environ 55°; ils sont en même temps dépouillés de leur activité destructive vis-à-vis des glo-

1. Il s'agit ici bien entendu, des actions bactéricides qui dépendent des alexines, et que ne produisent plus les sérums chauffés à 55°. L'exemple typique de ce genre d'actions est la métamorphose des vibrions en granules arrondis. Mais on peut trouver, dans certains sérums, des substances bactéricides nettement distinctes des alexines. Le sérum de rat, chauffé à 55°, est devenu absolument incapable de transformer en granules des vibrions cholériques sensibilisés par le choléra-sérum, tandis que le sérum de rat, intact, possède cette propriété commune d'ailleurs aux divers sérums neufs. Mais ce sérum de rat, chauffé, détruit de la façon la plus évidente, sans que son activité ait été diminuée, la bactérie charbonneuse. M. Sawtchenko a constaté antérieurement la résistance à une température de 55°-60° du pouvoir bactéricide spécial que le sérum de rat manifeste contre la bactérie charbonneuse.

bules. Les différences entre alexines de diverses provenances (différences qui se trahissent lorsque ces alexines agissent sur des globules) n'entrent guère en ligne de compte lorsque ces alexines agissent sur les vibrions.

Tandis que le fait de posséder des alexines ne caractérise pas exclusivement les sérums des vaccinés, puisque ces alexines se rencontrent avec les mêmes caractères dans les sérums neufs, les propriétés agglutinantes des vaccinés se distinguent nettement de celles qu'on trouve dans les sérums neufs ; elles sont en effet très intenses et douées du caractère de la spécificité. On peut néanmoins rechercher si, malgré ces différences, les agglutinines des vaccinés se comportent, sous l'action de la chaleur, de la même manière que les agglutinines des sérums neufs.

On peut commencer par établir dans quelle mesure l'action de la chaleur affaiblit les propriétés agglutinantes qu'un même sérum neuf manifeste, d'une part à l'égard de globules, d'autre part vis-à-vis de microbes. On choisit pour ce genre d'expériences certains bacilles très agglutinables, aptes à se réunir en amas sous l'influence de sérums neufs les plus divers. Nous opérons spécialement sur un échantillon de bacille de la fièvre typhoïde. Sans entrer dans le détail fastidieux de ces expériences, nous dirons, pour en exprimer le résultat général, que l'action d'une température suffisamment élevée fait perdre, en même temps, à un sérum neuf donné, d'une manière entièrement corrélative, la propriété d'agglutiner les microbes et celle d'agglutiner les globules. Pour les divers sérums, les propriétés agglutinantes ne sont pas atteintes par un chauffage à 55° pendant une demi-heure. Pour ce qui concerne les sérums de cobaye, chèvre, chien, cheval, poule, ces propriétés sont très nettement diminuées, mais non abolies à la suite d'un chauffage à 61°-62° pendant le même temps. Quand les expériences portent sur des sérums n'agglutinant que médiocrement, l'action agglomérante n'est presque plus constatable après un pareil chauffage ; elle est au contraire encore très visible, s'il s'agit d'agglutinations très fortes à l'origine. C'est ainsi qu'on peut encore distinguer l'agglutination des globules de lapin par le sérum de poule, même après un chauffage de ce dernier à 67°. Le pouvoir agglutinant devient de plus en plus faible, au fur et à mesure qu'on

met en jeu des sérums chauffés à des températures plus élevées; il n'est plus constatable chez les sérums neufs chauffés pendant une demi-heure à 70°.

Le sérum dans lequel les agglutinines résistent le mieux est, parmi les sérums que nous avons étudiés à ce point de vue, celui de lapin. Il faut pour observer dans ce sérum une diminution nette du pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules ou des microbes, le chauffer à 65° environ.

On rencontre des analogies très nettes encore lorsqu'on compare l'action de la chaleur, d'une part sur les agglutinines des sérums normaux, d'autre part sur celles (spécifiques) qui sont propres aux sérums des vaccinés. Il faut seulement tenir compte, dans ces essais, de ce que les agglutinations spécifiques sont beaucoup plus énergiques; en conséquence, une diminution apportée à leur activité ne se décèle pas avec autant d'évidence qu'un affaiblissement dans l'énergie, déjà faible à l'origine, des agglutinines de sérums neufs. On constate, par des expériences portant sur des sérums de chèvre, de lapin, de cobayes, vaccinés contre le vibrion cholérique, de chien vacciné contre le bacille de la fièvre typhoïde, que le pouvoir agglutinant spécifique est diminué lorsque le sérum a été exposé aux températures qui affaiblissent le pouvoir agglutinant normal; pour le cobaye, la chèvre, la diminution apparaît déjà après le chauffage à 61°-62°; ces sérums chauffés à 70° deviennent presque inactifs. Le sérum de lapin vacciné possède des agglutinines spécifiques nettement plus résistantes; nous avons vu plus haut qu'il en est de même pour les agglutinines normales du sérum de lapin neuf. Deux choléra-sérums, l'un provenant d'un cobaye, l'autre fourni par un lapin, ne se comportent donc pas tout à fait de même relativement à l'action de la chaleur; après un chauffage à 70°, la diminution d'activité n'est que partielle et même légère dans le second: elle est considérable dans le premier. Il faut observer que le sérum de lapin résiste mieux que celui du cobaye à l'action coagulante de la chaleur. Le sérum de cobaye mélangé à partie égale de solution de Na Cl à 0,7 0/0 ne se coagule pas après un chauffage à 65° (prolongé pendant une demi-heure), mais il devient opalescent; dans ces conditions, le sérum de lapin ne change pas d'aspect; il devient légèrement opalescent lorsqu'on l'a chauffé à 70°. Il est superflu

d'insister sur ce fait qu'il y a vraisemblablement des rapports étroits entre l'apparition d'une coagulation ou d'une opalescence et la diminution d'énergie des substances actives.

On peut dire, en résumé, que les diverses agglutinines agissant sur les globules ou les microbes *se comportent à peu près de même sous l'influence de la chaleur, qu'il s'agisse de sérums neufs ou de sérums spécifiques*. Elles diminuent progressivement d'activité, lorsqu'on les soumet à l'élévation de la température, sans qu'on puisse préciser une température critique au-dessous de laquelle elles restent intactes, au-dessus de laquelle elles se détruisent. Dans le sérum de certains animaux, les agglutinines se montrent plus résistantes qu'elles ne le sont dans le sérum d'autres espèces.

Puisque la chaleur affaiblit la propriété dont les sérums sont doués, d'agglutiner les globules et les microbes, on pouvait se demander si elle diminue dans le même rapport la propriété que possèdent les sérums spécifiques de sensibiliser les éléments figurés à l'action de l'alexine. La recherche a son intérêt, car elle peut contribuer à résoudre la question de savoir si le phénomène de la sensibilisation et celui de l'agglutination sont dus à une même substance ou à des substances différentes. Nous n'aborderons pas ici ce sujet, nous réservant d'examiner plus tard, dans leur signification, les faits qui se rattachent à cette question¹.

Bourbons-nous à constater ici que *l'exposition des sérums spécifiques à des températures de 65 à 70°, qui affaiblissent très visiblement le pouvoir agglutinant et immobilisant, diminue nettement le pouvoir sensibilisateur*. Le choléra-sérum de lapin, chauffé à 70°, et dont le pouvoir agglutinant vis-à-vis du vibron est devenu un peu moins énergique, est aussi légèrement affaibli dans son pouvoir sensibilisateur. Il faut, pour constater une semblable diminution, mettre des vibrions en contact avec des doses faibles et identiques, d'une part de sérum chauffé à 55°, d'autre part de sérum chauffé à 70°. Les deux émulsions ainsi obtenues sont inégalement agglutinées. Si on met, *in vitro*, ces

1. L'agglutination est un phénomène complexe. Par exemple, lorsqu'il s'agit de microbes mobiles, l'agglutination comporte et nécessite l'immobilisation de ces microbes. On n'a point démontré jusqu'ici que ces deux phénomènes sont dus à l'activité de la même substance. Le fait que l'agglutination résulte de la coopération de facteurs divers paraît très probable, si l'on se reporte aux expériences que nous avons relatées antérieurement et qui ont trait au rôle de NaCl dans l'agglutination.

deux émulsions en contact avec du sérum neuf, on constate que la transformation en granules est beaucoup moins étendue pour l'émulsion additionnée de sérum chauffé à 70° que pour celle contenant le sérum chauffé à 55°. De même, ces deux émulsions mises en contact *in vivo*, par injection dans le péritoine, avec l'exsudat péritonéal, se transforment très inégalement. Les cobayes qui reçoivent l'émulsion additionnée de sérum chauffé à 55° présentent dans leur exsudat la transformation granuleuse du vibrion, ils résistent; chez les autres, des vibrions mobiles persistent et l'infection mortelle se produit. — Si l'on emploie des doses de sérum notablement supérieures à la dose minimale active, la différence entre les deux émulsions ne se décèle plus nettement; — en effet, nous le répétons, l'affaiblissement des propriétés du sérum, sous l'influence du chauffage, n'a été que partiel. — Une semblable diminution s'observe, ainsi qu'il a été dit plus haut, pour ce qui concerne le sérum actif de lapin traité par le sang de poule, lorsqu'on porte ce sérum à la température de 70°.

La propriété sensibilisatrice du choléra-sérum de cobaye est, comme le pouvoir immobilisant et agglutinant, affaiblie sous l'action de températures inférieures à 70°; après un chauffage à 65°, l'affaiblissement est déjà très notable.

La propriété sensibilisatrice existe-t-elle dans les sérums neufs? Dans ces sérums, l'action de l'alexine n'est-elle pas favorisée par celle d'autres matières? Il est difficile d'en juger, car on n'a pu jusqu'ici isoler l'alexine des autres matières existant dans le sérum. Cependant, en combinant l'action des deux sérums neufs, on peut constater parfois l'existence d'une propriété sensibilisatrice. C'est ainsi que des vibrions cholériques, immobilisés et agglutinés par du sérum de cheval neuf, se transforment aisément en granules lorsqu'on ajoute au mélange du sérum neuf (de cobaye). Il faudrait cependant se garder de généraliser la portée de cette observation; on ne pourrait conclure qu'il suffit d'agglutiner des microbes ou des globules pour les sensibiliser à l'action de l'alexine. Par exemple, des globules rouges de lapin, fortement agglutinés par du sérum de poule chauffé à 55°, ne sont nullement devenus plus accessibles à la légère action dissolvante que le sérum de cobaye neuf exerce sur eux. L'existence de l'agglutination n'implique donc pas for-

cément l'apparition d'une sensibilité particulière vis-à-vis de l'alexine. Ces questions nécessitent de nouvelles recherches.

CONCLUSIONS

I. — Le sérum d'animaux traités par du sang défibriné provenant d'un animal d'espèce différente manifeste des propriétés actives, consistant en ce qu'il agglutine et dissout avec énergie les globules semblables à ceux qu'on a injectés. Il est doué aussi, dans certains cas, du pouvoir de faire naître un précipité dans le sérum (ou le sang défibriné) semblable à celui qui a été introduit dans l'organisme.

II. — L'action dissolvante du sérum actif sur les globules est due à l'influence de deux substances ; l'une appartient en propre au sérum actif ; l'autre (alexine) est répandue aussi bien dans les sérums neufs que dans les sérums actifs. La première agit en sensibilisant les globules à l'action de la seconde. Ces faits doivent être étroitement rapprochés de ceux que nous avons établis pour ce qui concerne le choléra-sérum et le vibrion cholérique.

III. — L'injection de sérum antihématique à un animal neuf (de même espèce que celui dont le sérum actif provient) provoque chez cet animal l'apparition d'un pouvoir globulicide du sérum. La production de ce pouvoir globulicide doit être expliquée conformément à la manière de voir que nous avons émise en 1895, et qui est relative à la cause du pouvoir bactéricide constatable dans le sérum d'animaux injectés de choléra-sérum. Ce pouvoir globulicide apparaît, grâce à la rencontre, dans l'organisme, de la matière propre au sérum actif avec l'alexine que cet organisme possédait avant toute intervention.

IV. — Les matières antihématiques spécifiques, résistant à la température de 55° et qui caractérisent le sérum actif, se fixent avec énergie sur les globules qu'elles peuvent impressionner. Le lavage n'enlève pas aux globules les caractères (agglutination, sensibilisation à l'alexine) qu'ils ont acquis par le contact avec ces substances. L'analogie avec ce qui se passe pour les microbes est complète à ce point de vue encore.

V. — Les alexines de provenances diverses, lesquelles se comportent à peu près de même dans leur action sur un même

microbe (quelle que soit l'espèce animale qui les ait fournies) présentent entre elles des différences lorsqu'on les étudie au point de vue de leur action sur les globules. Par exemple, la sensibilisation de globules à l'action d'alexines de certains animaux n'implique pas nécessairement que ces globules soient devenus facilement destructibles sous l'influence de toutes les alexines.

VI. — Les sérums antihématiques présentent aussi un pouvoir antitoxique bien constatable; ils peuvent protéger les globules contre l'agglutination et la dissolution par un sérum neuf identique à celui qu'on a injecté aux animaux producteurs du sérum actif.

VII. — Il existe des analogies très nettes, au point de vue de l'action de la chaleur, entre les matières actives des sérums spécifiques et celles, douées de propriétés comparables, qui existent dans les sérums neufs; il en existe aussi, à ce point de vue, entre celles qui influencent les microbes et celles qui impressionnent les globules rouges. L'action de la chaleur (60 à 70°) affaiblit la propriété agglutinante et la propriété sensibilisatrice.

VIII. — La destruction par l'alexine peut s'observer sur des globules qui n'ont pas été agglomérés. — Le fait que des globules sont agglomérés par un sérum n'implique pas nécessairement qu'ils sont sensibilisés à l'action des alexines.

DU MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ

VIS-A-VIS DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR LE D^r GHÉORGHIEWSKY (SAINT-PÉTERSBOURG).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

En étudiant le mécanisme de l'immunité chez les cobayes vis-à-vis du bacille pyocyanique, M. Wassermann (1) conclut que la destruction des microbes introduits dans la cavité péritonéale se fait sans l'intervention des leucocytes. D'après ce savant, les bactéries, aussitôt après leur arrivée dans la cavité péritonéale, deviennent immobiles, se gonflent, et finissent par s'y dissoudre comme la cire dans de l'eau chaude. On constate rarement la transformation en granules, comme c'est le cas pour le choléra. Cette destruction de bactéries s'effectue assez rapidement, car déjà 6 heures après l'inoculation le contenu péritonéalensemencé ne donne plus de culture. Quelquefois, cependant, on voit se développer des colonies isolées, mais celles-ci sont le plus souvent privées du pigment, ce qui, pour l'auteur, constitue un signe de dégénérescence des microbes.

M. Charrin (2), dans une série des travaux, a étudié le sort du bac. pyocyanique dans le corps d'animaux immunisés. Sans nier tout à fait l'importance de la phagocytose, c'est aux humeurs surtout, exerçant une action atténuante sur les microbes, qu'il attribue le rôle prépondérant dans la lutte de l'organisme.

Sans entrer dans l'analyse des arguments apportés par l'auteur à l'appui de sa conclusion, analyse qui a d'ailleurs déjà été faite en 1892, par M. Metchnikoff (*Semaine médicale*, p. 469; 1892), je dois mentionner un fait qui plaide, d'après M. Charrin, en faveur de l'action atténuante exercée sur les microbes par les humeurs des animaux immunisés : c'est que le bac. pyocyanique, ensemencé sur le sérum des animaux neufs (lapins), possède la propriété de fabriquer de la pyocyanine, tandis que cette

propriété fait défaut si on l'ensemence sur sérum des animaux immunisés.

Les idées qui viennent d'être exposées étant en contradiction avec ce que l'on sait sur l'immunité en général, à l'égard d'autres microbes, nous avons étudié, sur le conseil de M. Metchnikoff, le sort du bac. pyocyanique dans le corps d'animaux immunisés, afin d'éclairer, au point de vue du mécanisme de l'immunité, active et passive, les propriétés acquises par le sérum lors de l'immunisation contre le microbe.

De plus, le bac. pyocyanique étant aussi pathogène pour certains animaux à sang froid, comme l'ont démontré MM. Krel et Soetbeer (3), nous avons recherché si ces vertébrés inférieurs sont capables d'acquérir l'immunité, et, dans le cas positif, par quel mécanisme.

Nous nous sommes servi d'une culture du bac. pyocyanique donnée par M. Metchnikoff. 1/120 de la culture de 24 heures sur gélose, injectée dans le péritoine, tuait un cobaye de 300 gr. dans 18—24 heures.

Avant de décrire le sort du bacille pyocyanique introduit dans le corps de l'animal immunisé, je désire attirer l'attention sur quelques particularités observées au cours de l'infection pyocyanique ; j'étudierai également comment réagissent des cobayes neufs présentant une certaine résistance vis-à-vis du bac. pyocyanique, en présence d'une dose non mortelle de ce dernier.

Lorsqu'on injecte, dans le péritoine d'un cobaye neuf de 300 à 400 grammes, une dose mortelle du bac. pyocyanique (dans notre cas 1/100 de la culture de 24 heures sur gélose) et qu'on prélève à l'aide d'un tube effilé un peu de liquide péritonéal, voici ce qu'on observe. Dans les premiers moments qui suivent l'injection, les bactéries conservent leur mobilité et leur faculté de se colorer. Les leucocytes, moins nombreux qu'avant l'inoculation, sont presque exclusivement constitués par des mononucléaires. La phagocytose fait défaut. Quelquefois déjà au bout de 15 à 20 minutes, on peut observer une modification particulière des leucocytes qui nous a été indiquée par M. Metchnikoff ; elle consiste en ce que certains leucocytes perdent leurs mouvements amiboïdes. A leur pourtour on voit apparaître un anneau clair, et, plus vers le centre, on voit des grains de protoplasma

réunis ; le corps du leucocyte devient transparent, sauf un point de la périphérie qui est le siège d'un petit amas de protoplasma granuleux. Au milieu de cette masse leucocytaire transparente, on aperçoit les contours du noyau, qui se présente aussi sous forme d'une vacuole claire. La coloration par le bleu de méthylène et l'éosine permet de constater que les noyaux des polynucléaires ayant subi les transformations décrites, augmentent de volume, se fusionnent en formant un noyau unique à forme arrondie ; ce noyau ne prend pas la couleur aussi bien que les noyaux des leucocytes sains ; il présente en plus l'aspect réticulé. Le protoplasma, qui existe en petite quantité, s'agglomère principalement sur un point quelconque de la périphérie, et se colore en rose clair par l'éosine. Le nombre de leucocytes ainsi transformés augmente de plus en plus. Au bout de 4 à 5 heures, l'exsudat contient déjà une quantité considérable de leucocytes qui presque tous viennent de subir cette transformation ; c'est à peine si l'on en trouve encore quelques-uns qui ont conservé leur aspect normal. La phagocytose est peu marquée ; les bactéries continuent à se multiplier en conservant leur mobilité et leur aspect extérieur ; la mort apparaît au milieu de ces phénomènes, 18 à 20 heures après l'inoculation.

On observe de la sorte au cours de l'infection pyocyanique ce phénomène intéressant que les leucocytes, mis en contact avec les bactéries, subissent une sorte de dégénérescence à l'intérieur même de l'organisme.

Un phénomène analogue a été décrit par Van de Velde (4) chez des lapins au cours de l'infection staphylococcique. En introduisant dans la cavité pleurale des cultures vivantes et virulentes de staphylocoques, Van de Velde a observé une dégénérescence analogue des leucocytes. Il a obtenu le même résultat en faisant arriver sur les leucocytes d'un lapin neuf une goutte d'exsudat péritonéal déterminé par une culture vivante de staphylocoques, et même, mais pas aussi nettement, avec la culture elle-même. M. Van de Velde en conclut que le staphylocoque élabore, notamment à l'intérieur de l'organisme, un poison particulier qui tue les globules blancs ; il appelle ce poison *leucocidine*.

Nous avons aussi réussi à réaliser la transformation des leucocytes en dehors de l'organisme dans une goutte pendante, en mélangeant les globules blancs de cobaye normal avec une goutte

de la culture pyocyannique de 24 heures sur gélose, ou bien avec une goutte d'exsudat péritonéal d'un cobaye ayant reçu la dose mortelle du bac. pyocyannique.

Cette transformation des leucocytes *in vitro* ne s'accomplit pas cependant aussi rapidement qu'avec le microbe de Van de Velde ; elle n'apparaît qu'après 20 à 30 minutes du séjour de la goutte pendante à l'étuve à 36° ; elle n'a pas lieu lorsqu'on mélange des leucocytes de cobaye neuf avec une goutte de la culture pyocyannique préalablement tuée à 80°, ou bien avec de la toxine, même après 2 à 3 heures de séjour à l'étuve à 36° en goutte pendante. Elle n'a pas lieu non plus à l'intérieur même de l'organisme ; quand on injecte dans le péritoine du cobaye une dose mortelle de toxine pyocyannique, l'animal meurt dans les 24 heures, et les leucocytes de la cavité péritonéale conservent dans ce cas leur aspect ordinaire. D'où nous avons conclu que cette modification et cette dégénérescence des leucocytes ne tient pas à la toxine du bac. pyocyannique causant la mort de l'animal.

Nous ne pouvons pas dire jusqu'à quel point cette modification leucocytaire est spécifique, et si elle peut avoir lieu en dehors de l'organisme sans l'intervention des microbes ; faisons seulement remarquer que cette dégénérescence et cette modification de l'aspect extérieur des leucocytes se produit dans l'organisme même au cours de l'infection pyocyannique.

Voyons maintenant comment les cobayes neufs, qui jouissent, comme nous le savons, d'une certaine immunité vis-à-vis du bac. pyocyannique, réagissent en présence de la dose non mortelle de ces bacilles.

Dans les premiers moments qui suivent l'injection de notre bacille (1/150 de la culture sur gélose) dans le péritoine des cobayes neufs, les phénomènes sont les mêmes que dans le cas de la dose mortelle. Les bactéries restent mobiles, conservent leur aspect et se colorent bien.

Au début, il y a peu de leucocytes, et ceux-ci sont presque exclusivement des mononucléaires ; il n'y a presque pas de phagocytose. Après 30 à 40 minutes, certains leucocytes perdent leurs mouvements amiboïdes, et se transforment en globules transparents, présentant un amas de protoplasma granuleux à la périphérie. Au bout de 2 à 3 heures, au moment où s'établit la leuco-

cytose, on voit quelques leucocytes subir la dégénérescence, tandis que d'autres commencent à englober les bactéries.

A ce moment on peut voir un grand nombre de bactéries à l'intérieur des polynucléaires.

La majorité des bactéries englobées conservent leur aspect extérieur et prennent bien les couleurs.

Quelques-unes cependant, — en petit nombre, — se colorent faiblement et d'une façon inégale par le bleu de méthylène ; en plus, on observe rarement à l'intérieur des leucocytes des bactéries se colorant en rouge par l'éosine ; en même temps on peut observer à l'intérieur de certains leucocytes des bactéries transformées en granules prenant bien le bleu de méthylène. A côté de cela, l'on y trouve aussi, en dehors des cellules, quelques bactéries se colorant faiblement et transformées en granulations, mais cela tient à ce que, pendant que l'on fait la préparation, de nombreux leucocytes viennent à se détruire et à mettre ainsi en liberté des bactéries qu'ils contenaient.

La phagocytose était plus ou moins accentuée selon la dose des bactéries injectées, mais déjà au bout de 6 à 7 heures, la plupart du temps, lorsqu'on prélevait une goutte du contenu péritonéal, on n'y voyait plus de bactéries libres ; elles étaient toutes englobées par les leucocytes.

Au fur et à mesure que les bactéries venaient à être englobées, le nombre des leucocytes modifiés diminuait, et déjà 7-8 heures après l'inoculation il était très difficile d'en trouver. Le contenu de la cavité péritonéale était à ce moment formé d'une masse de leucocytes, presque exclusivement de polynucléaires, dont quelques-uns contenaient à leur intérieur tantôt des bactéries se colorant bien ou mal, tantôt des bactéries transformées en granulations ; le liquide péritonéalensemencé donnait des cultures de *B. pyocyanique* qui, sur les milieux ordinaires, élaborait le pigment bleu. Mis à l'étuve à 36° en goutte pendante, le liquide péritonéal permettait de constater au bout de quelques heures la multiplication du *B. pyocyanique* contenu dans certains leucocytes.

Le lendemain, en examinant une goutte retirée de la cavité péritonéale, on ne pouvait plus constater des bactéries ni en dehors ni en dedans des leucocytes. Une goutte semblableensemencée donnait lieu la plupart du temps à des colonies isolées,

produisant du pigment bleu. Les ensemencements faits après 48 heures ne donnaient habituellement plus de colonies, et restaient stériles.

Nous voyons donc que la résistance des cobayes neufs non immunisés vis-à-vis du *B. pyocyanique* se traduit par l'apparition de la réaction phagocytaire.

*
* *

Pour étudier le sort du *B. pyocyanique* dans le corps des animaux activement et passivement immunisés, nous nous sommes principalement servi des cobayes, que nous avons immunisés pendant un temps assez long, en leur injectant dans le péritoine des cultures vivantes de 24 heures sur gélose; nous nous sommes aussi servi d'une chèvre, qui a été immunisée pendant de longs mois par des injections sous-cutanées de cultures vivantes de 24 heures sur gélose.

Le sérum des animaux ainsi immunisés avait acquis, outre la propriété préventive (propriété de conférer l'immunité passive à un autre animal), encore d'autres propriétés *in vitro* qui le distinguaient du sérum des animaux de même espèce, mais non immunisés. C'est de l'étude de ces propriétés et de leur signification pour l'immunité que nous allons maintenant nous occuper.

M. Wassermann fait remarquer, dans son travail, que le sérum des animaux immunisés contre le *B. pyocyanique* ne possède pas *in vitro* des propriétés bactéricides vis-à-vis de ce microbe.

Nous avons pu nous assurer également que le *B. pyocyanique* pousse très bien dans le sérum des animaux immunisés contre lui, conserve sa forme, sa colorabilité et sa virulence : seulement il donne des colonies agglutinées.

Lorsqu'on prend une culture de 24 heures ayant poussé dans le sérum préventif des cobayes ou de la chèvre, et que l'on repique ensuite sur la gélose, il est facile de s'assurer que la virulence de notre microbe n'est nullement modifiée après le passage *in vitro* par le sérum des animaux immunisés. En un mot notre sérum préventif n'exerçait *in vitro* aucune action nocive sur le *B. pyocyanique*, n'arrêtait pas son développement et ne diminuait pas sa virulence.

Le sérum des cobayes et des lapins immunisés contre le *B.*

pyocyannique acquiert la propriété d'agglutiner ce bacille (le sérum neuf de ces animaux n'agglutine pas); quant au sérum de chèvre qui agglutine déjà faiblement (1 : 10) le *B. pyocyannique* à l'état normal, il devient au cours d'immunisation fortement agglutinant. Le pouvoir agglutinant des sérums des animaux immunisés variait avec l'espèce animale; ainsi, le sérum préventif de la chèvre agglutinait une culture du *B. pyocyannique* de 24 heures sur gélose à la dose de 1 : 10,000; le sérum préventif des lapins à la dose de 1 : 2,000, 1 : 4,000; le sérum préventif des cobayes à la dose de 1 : 200, 1 : 600.

Ayant de la sorte à notre disposition des sérums de pouvoir agglutinant variable, il a été intéressant de voir les rapports qui existent entre le pouvoir préventif et le pouvoir agglutinant. A cet effet, nous avons pris du sérum préventif de la chèvre présentant le maximum du pouvoir agglutinant (1 : 10 000), et du sérum préventif de lapin dont le pouvoir d'agglutiner est moindre (1 : 2,000), et nous avons étudié comparativement leur action préventive sur les cobayes.

De nombreuses expériences nous ont montré que le sérum de la chèvre, bien qu'il fût plus agglutinant, se montrait toujours moins préventif que celui de lapin. Le résultat était le même lorsque nous nous servions, pour notre expérience, du sérum frais, non chauffé, au lieu de sérum préalablement chauffé à 55° pendant une heure. Nous avons obtenu des résultats analogues, bien que moins nets, en comparant le pouvoir préventif du sérum de la chèvre avec celui de cobaye, dont la propriété agglutinante était beaucoup inférieure (1 : 200); dans beaucoup d'expériences, nous avons pu voir que l'effet préventif des deux sérums était le même, et dans certains cas le sérum de cobayes se montrait même plus préventif que celui de la chèvre. Il en ressort donc que la propriété des sérums d'agglutiner le *B. pyocyannique* ne marche pas parallèlement avec leur propriété préventive.

M. Charrin constate ce fait dont il a déjà été question plus haut, que le *B. pyocyannique* se développant sur sérum d'animal neuf (lapin) commence au bout d'un certain temps (6-7 jours) à fabriquer un pigment bleu, la pyocyanine, tandis que le même bacille ensemencé sur le sérum d'un lapin immunisé ne donne point de pigment, et en ceci l'auteur voit la preuve de l'action

destructive des humeurs des animaux immunisés sur le microbe.

Nous pouvons confirmer l'observation de M. Charrin ; en effet, le *B. pyocyanique* ensemencé sur le sérum de nos cobayes immunisés n'élaborait pas de pigment, même au bout de 1-2 mois, tandis que celui-ci apparaissait déjà après 4-5 jours sur sérum des cobayes neufs. De plus, il a suffi d'ajouter au sérum des cobayes neufs un peu de sérum provenant d'un cobaye immunisé, pour empêcher l'élaboration du pigment bleu chez le *B. pyocyanique* poussant dans ce mélange.

Voyons maintenant quelle est la cause de ce phénomène. Peut-on le considérer comme indiquant la dégénérescence du microbe, et en quel rapport ce phénomène se trouve-t-il avec l'immunité?

Je vais décrire d'abord quelques procédés techniques dont je me suis servi pour surprendre à son début la formation du pigment dans le sérum donné. Une solution de gélose dans de l'eau distillée à 1,5 0/0, filtrée et stérilisée, après avoir été refroidie jusqu'à 40°, était additionnée d'un volume égal du sérum à examiner ; nous abandonnions le mélange du sérum et de la gélose dans un tube incliné. Quand le *B. pyocyanique*, en cultivant sur ce milieu, commençait à former le pigment bleu, le contenu du tube prenait peu à peu la couleur verte foncée. Afin de s'assurer que cette couleur tenait à la présence de la pyocyanine, il suffisait de fondre la gélose par le chauffage, de la refroidir jusqu'à 40° et d'extraire le pigment avec du chloroforme.

De nombreuses expériences m'ont montré que le moment de l'apparition du pigment bleu sur ce milieu coïncidait avec celui que l'on observait dans le sérum correspondant, non additionné de gélose.

M. Gessard (5) affirme que le *B. pyocyanique*, mis dans un milieu purement albuminoïde, n'élabore pas le pigment bleu, mais seulement un pigment verdâtre.

En ensemencant notre microbe sur des sérums de différents animaux neufs, non immunisés, nous avons remarqué qu'en effet, pendant les premiers jours, il se forme seulement un pigment verdâtre, puis au bout d'un certain temps, variable selon l'espèce animale, apparaissait le pigment bleu. Ainsi, celui-ci apparaît après 4-6 jours, le *B. pyocyanique* étant ensemencé sur du sérum de cobaye neuf ; il apparaît dans 6-9 jours, l'ensemencement

étant fait sur du sérum de lapin neuf; quant au sérum de chèvre, même après deux mois, nous n'avons pas vu le pigment se former. Lors d'ensemencements sur l'albumine d'œuf, le pigment faisait défaut la plupart du temps : quelquefois il apparaissait, mais très tard, au bout de 24-28 jours. Le pigment faisait totalement défaut pendant deux mois sur du sérum des animaux immunisés contre le *B. pyocyannique* (soit avec des cultures vivantes ou chauffées à 80° pendant 30 minutes, soit avec la toxine obtenue par le procédé de Wassermann), ainsi que dans le mélange du sérum neuf de cobaye avec du sérum d'un animal immunisé. Mais il suffisait de prendre une culture de pyocyanine, même vieille de 20-30 jours, ayant poussé sur du sérum spécifique, et la transporter dans un milieu ordinaire, pour voir apparaître le pigment bleu dans l'espace du temps qui lui est ordinairement nécessaire. Ceci nous prouvait que le *B. pyocyannique*, du fait d'avoir poussé sur du sérum d'animaux immunisés, n'a nullement perdu sa propriété de produire son pigment, et que celle-ci n'a pas même été diminuée. De plus, il suffit d'ajouter au sérum de l'animal immunisé, ainsi qu'à l'albumine de l'œuf, quelques gouttes d'une solution stérilisée de peptone, pour constater le lendemain la présence de la pyocyanine. On obtient le même résultat quand, au lieu de la peptone, on ajoute une petite quantité de papayotine rendue stérile par la filtration à travers la bougie Chamberland. La papayotine, en peptonisant l'albumine, fournissait ainsi le matériel pour la fabrication du pigment bleu.

Nous avons constaté ensuite que si on coagule l'albumine d'œuf, ou le sérum de nos animaux immunisés, dans un tube à essai en les chauffant à 75°, et si ensuite on yensemence notre microbe, celui-ci ne pousse pendant les premiers jours qu'à la surface de l'albumine coagulée et ne donne pas de pigment; puis, après 4 à 6 jours, l'albumine coagulée commence à se liquéfier, et le pigment bleu paraît alors aussitôt. Nous avons conclu que le *B. pyocyannique*, en poussant sur le milieu albuminoïde, est capable de peptoniser l'albumine, et que c'est précisément pour cette raison que, quelquefois, ensemencé dans un milieu purement albuminoïde, il ne se met à élaborer le pigment bleu qu'après un certain intervalle; ensemencé dans un milieu contenant de la peptone, il fabrique le pigment d'une façon habi-

tuelle. Mais on peut se demander maintenant pourquoi le *B. pyocyanique* ne peptonise pas d'une façon égale l'albumine de tous les sérums, et pourquoi il n'est pas capable de peptoniser lorsqu'il s'agit des sérums (ou bien d'œdème) des animaux immunisés, après avoir pu peptoniser les mêmes sérums avant l'immunisation? Nous ne pouvons pas répondre actuellement à cette question. Il est évident qu'il faut en chercher la cause dans les modifications que subit dans sa constitution le sérum sous l'influence de l'infection. Tout en ignorant la nature de ces modifications, nous pourrions cependant prouver que cette nouvelle propriété acquise par le sérum *in vitro* n'atténue guère la virulence de notre bacille, n'a aucun rapport ni avec le pouvoir préventif de nos sérums ni avec la résistance qu'ont présentée nos animaux immunisés vis-à-vis de ce microbe.

Nous avons déjà vu qu'à la suite du passage de notre bacille *in vitro* par le sérum de l'animal immunisé, sa virulence n'a été nullement diminuée. J'ai déjà mentionné, en plus, que le *B. pyocyanique*, ensemencé sur du sérum neuf de chèvre, ne donne pas de pigment bleu, même au bout de deux mois, et cependant ce sérum ne jouissait d'aucun pouvoir préventif vis-à-vis du *B. pyocyanique*, même à dose considérable : 3 c.c.

Le cobaye qui avait reçu la veille sous la peau 2-3 c.c. de ce sérum fournissait, 24 heures après, un sérum sur lequel le *B. pyocyanique* poussait sans former de pigment; quant au cobaye lui-même, il ne devenait pas, comme nous l'avons déjà dit tout à l'heure, sensiblement plus résistant à la suite de l'injection de ce sérum. Enfin, quand on injectait à un cobaye immunisé une dose de culture qui le tuait, son sérum n'en cessait pas moins de manifester la propriété acquise au cours de l'immunisation.

M. Denys (6) a observé ce fait que le sérum des lapins immunisés contre les staphylocoques possède la propriété de neutraliser *in vitro* l'action de la leucocidine de Van de Velde sur les leucocytes d'un lapin neuf; il a appelé cette substance neutralisante : antileucocidine.

Dans l'infection pyocyanique, il existe aussi, comme nous l'avons vu, une dégénérescence des leucocytes, venant en contact avec les microbes, et cela à l'intérieur de l'organisme. Il était intéressant de savoir si le sérum de nos animaux immu-

nisés n'acquiert pas la propriété d'empêcher, *in vitro*, l'action destructive exercée par les B. pyocyaniques vis-à-vis des leucocytes.

En ajoutant à des leucocytes d'un cobaye neuf un peu de sérum d'un animal immunisé et une goutte de culture, nous avons constaté que notre sérum préventif n'empêchait nullement la dégénérescence leucocytaire, laquelle parfois survenait même plus rapidement que lorsqu'il n'y avait pas de sérum. Les mêmes résultats négatifs étaient à observer lorsque, au lieu de sérum préventif, nous employions le sérum antitoxique des cobayes ou de la chèvre.

M. Wassermann, en constatant que le sérum des animaux immunisés contre le B. pyocyanique ne possède *in vitro* aucun pouvoir bactéricide, suppose que ce pouvoir apparaît seulement dans l'organisme, après que l'on y a introduit le sérum préventif, et que c'est grâce à ce pouvoir bactéricide que se fait, dans l'organisme, la dissolution des bactéries en dehors des cellules.

Pour voir quel est le mode d'action de notre sérum préventif dans l'organisme, nous avons fait l'expérience suivante : nous avons introduit, dans la cavité péritonéale d'un cobaye bien immunisé avec des cultures vivantes, un sac en collodion avec toutes les précautions d'asepsie ; ce sac était préalablement rempli du sérum préventif de la chèvre, dans lequel nous avonsensemencé notre microbe.

Trois jours après, en ouvrant la cavité péritonéale, nous avons vu le sac entouré des fausses membranes et des leucocytes ; son contenu était trouble. L'examen microscopique a montré que ce trouble était dû à quantité de colonies agglutinées du B. pyocyanique. Les microbes ont conservé leur aspect normal, ainsi que la faculté de se colorer et leur virulence, ce dont on a pu s'assurer par les procédés ordinaires.

D'où nous avons pu conclure que, même dans l'organisme, le sérum des animaux immunisés n'exerce, vis-à-vis du B. pyocyanique, aucune action ni bactéricide ni atténuante.

Comment se fait donc la destruction du B. pyocyanique dans l'organisme des animaux immunisés ? Pour répondre à cette question, voyons ce que deviennent les microbes lorsqu'on les

injecte sous la peau ou dans le péritoine d'un animal bien immunisé.

Quand on injecte à un cobaye bien immunisé une dose, non mortelle pour lui, de culture pyocyanique de 24 heures sur gélose, voici ce que l'on observe en examinant le liquide péritonéal. Pendant les premiers moments qui suivent l'inoculation, l'examen en goutte pendante montre les bactéries en dehors des cellules, immobiles, et déjà en certains endroits agglutinées en petits amas pendant les 30 à 40 secondes nécessaires pour faire la préparation en goutte pendante. Cette agglutination augmente rapidement et devient très nette, déjà au bout de quelques minutes du séjour du liquide en goutte pendante. Les bactéries présentent toutes leur aspect normal, mais elles semblent un peu plus trapues, un peu épaissies. On n'observe pas de transformation en granules. Les leucocytes sont peu nombreux et non modifiés. En faisant des préparations colorées, on voyait qu'ils sont presque tous des mononucléaires, et ne contiennent pas à l'intérieur des bactéries. Quelquefois, mais rarement, on voit des polynucléaires ayant englobé des bactéries. Certaines de ces bactéries englobées se colorent mal et d'une façon inégale, d'autres sont transformées en boules, mais la plupart continuent à prendre bien les couleurs, tout en conservant leur forme ordinaire. Les bactéries qui restent en dehors des leucocytes conservent également presque toutes leur forme et leur colorabilité normales.

Nous n'avons jamais pu observer la transformation totale de la grande partie des microbes en boules — en dehors des cellules, comme cela a lieu dans le choléra. Il est vrai que déjà, dans les premiers moments après l'inoculation, on peut remarquer, sur les préparations colorées, en dehors des leucocytes, des bactéries qui se colorent mal et sont même transformées en boules ; mais rien ne nous prouve que ce ne soient pas les bactéries ayant déjà séjourné à l'intérieur des leucocytes et échappées des leucocytes détruits au moment où l'on faisait la préparation. Bien qu'on puisse admettre qu'en injectant la culture dans la cavité péritonéale, certaines bactéries plus faibles seraient transformées en boules par les substances provenant de la destruction de leucocytes qui a toujours lieu dans ce cas, qu'il se produirait, pour ainsi dire, un phénomène de Pfeiffer

incomplet, nous avons des preuves que cette transformation des bactéries s'effectue dans notre cas, non sans intervention des leucocytes, et notamment dans l'intérieur de ces derniers. Cette transformation des bactéries ne s'observe pas lorsqu'on mélange *in vitro* une goutte de notre culture avec du sérum d'un animal solidement immunisé ; mais il suffit d'ajouter à ce mélange un peu des leucocytes d'un cobaye immunisé, ou même d'un cobaye neuf, pour voir, quelques minutes après, sur des préparations colorées, une quantité de bactéries à l'intérieur des leucocytes, et ces bactéries en grande partie déjà transformées en boules. Remarquons que ce phénomène est surtout net lorsqu'on ajoute des leucocytes d'un animal immunisé.

Au bout de 20 à 30 minutes après l'injection de la culture, quelques leucocytes commençaient à perdre leurs mouvements amiboïdes et à présenter cette transformation de leur aspect extérieur que nous avons signalée chez des cobayes non immunisés.

Au bout de deux heures environ apparaissait la leucocytose : les leucocytes englobaient rapidement les bactéries, de sorte que, après 3 à 4 heures, on ne pouvait plus constater, dans une goutte retirée de la cavité péritonéale, des bactéries libres en dehors des cellules ; toutes se trouvaient à l'intérieur des polynucléaires. Une partie de ces bactéries prenaient bien les couleurs et conservaient leur forme, d'autres se coloraient mal et inégalement, d'autres enfin étaient transformées en boules. On en trouvait parfois qui se coloraient par l'éosine en rouge. Quand on mettait un peu de cet exsudat en goutte pendante à l'étuve à 37°, on pouvait constater que les bactéries, se trouvant à l'intérieur des leucocytes, commençaient à se multiplier et à donner des colonies, d'où il faut conclure qu'elles ont été englobées à l'état vivant.

Plus on s'éloignait du moment de l'inoculation, plus les leucocytes, contenant à leur intérieur des bactéries, devenaient rares, et déjà au bout de 5 à 6 heures il était difficile d'en trouver. Le nombre des leucocytes transformés diminuait à mesure que les bactéries étaient englobées, et ils disparaissaient presque totalement 6 à 7 heures après l'inoculation. Alors que les préparations colorées ne montraient plus de microbes, les ensemencements dans des milieux ordinaires donnaient encore pendant

24 à 30 heures des colonies isolées de *B. pyocyanique*, capable de donner un bon pigment.

Lorsqu'on sacrifiait le cobaye après que l'examen du liquide péritonéal ne faisait plus voir de microbes, ni en dedans ni en dehors des leucocytes, on remarquait sur les parois de la cavité péritonéale, surtout sur le foie et le grand épiploon, des petits amas blancs, se détachant facilement, et formés de leucocytes, surtout de polynucléaires; au milieu et à l'intérieur de ces derniers, on pouvait voir des bactéries en partie bien conservées, en partie déjà dans différents stades de destruction. En ensemençant ces amas blancs, on obtenait toujours des cultures donnant le pigment bleu. En fixant des fragments du grand épiploon, du foie et d'autres organes de la cavité péritonéale, nous avons vu, après les avoir inclus dans la paraffine et préparé des coupes, un amas des éléments cellulaires sous la couche péritonéale; dans différents endroits, on pouvait voir des bactéries, qui tantôt avaient conservé leur forme, tantôt présentaient différents stades de destruction.

24 à 30 heures après l'inoculation, les amas leucocytaires devenaient plus rares à la surface péritonéale, et il était difficile d'y voir des bactéries. Après 2 à 3 jours, on pouvait constater par places, sous le revêtement péritonéal, des petits points blancs: c'était des amas des globules blancs; ils étaient surtout nombreux sous le revêtement péritonéal du grand épiploon, puis sous celui du foie, des intestins et d'autres organes, plus rares sur la paroi péritonéale. Le contenu de la cavité péritonéale ne donnait alors plus de colonies en milieux ordinaires, mais lorsqu'on ensemait le contenu des amas cellulaires sous-péritonéaux, on obtenait presque toujours des colonies de *B. pyocyanique* fournissant du pigment bleu. L'examen des coupes nous a montré que ces amas d'éléments cellulaires se trouvent dans le tissu cellulaire sous-péritonéal; nous n'avons pas toujours réussi à y constater la présence des bactéries. Quelquefois, en injectant à des cobayes neufs ou immunisés, dans le péritoine, une dose étant à la limite de la dose sûrement mortelle et de la dose non mortelle, on provoquait la mort dans 3 à 5 jours. Dans ces cas, il était la plupart du temps impossible de trouver des microbes dans le sang du cœur; quant au contenu péritonéal, quelquefois, ensemencé en milieux ordinaires, il donnait des

cultures, d'autres fois il n'en donnait pas ; mais dans tous les cas, sans exception, il existait, sous toute la couche péritonéale, notamment sous celle du foie et du grand épiploon, une quantité considérable d'abcès dont le contenu donnait toujours des colonies du *B. pyocyanique*.

Remarquons que nulle part, dans les organes ou d'autres parties du corps, nous n'avons constaté de pareils amas cellulaires, dont le siège constant est le tissu sous-péritonéal.

De tout ceci on peut conclure que lorsque après avoir injecté des cultures du *B. pyocyanique* dans le péritoine des cobayes, nous ne constatons plus sur les préparations colorées la présence des microbes, cela ne veut point dire que tous les microbes injectés sont déjà détruits ; loin de là : une partie de ceux-ci se dépose avec des leucocytes à la surface péritonéale ; une autre partie est entraînée par les phagocytes dans le tissu cellulaire sous-péritonéal, et c'est là que se poursuit la lutte entre les bactéries et l'organisme au moyen des éléments cellulaires, et ce sont quelquefois les bactéries qui en sortent vainqueurs.

En injectant le *B. pyocyanique* dans le péritoine d'un cobaye passivement immunisé, — par une injection préalable sous la peau d'une certaine dose de sérum préventif (ce sérum n'est pas antitoxique dans notre cas), — nous avons observé la même lutte de l'organisme contre les bactéries que chez le cobaye activement immunisé. Nous n'avons jamais constaté ni la dissolution des bactéries dans les humeurs de l'organisme, ni leur transformation totale en boules en dehors des phagocytes. Par contre, la résistance que présentait l'animal était toujours en raison directe de la rapidité d'apparition et du degré de la réaction phagocytaire.

On peut faire ressortir l'importance de la rapidité de l'apparition de la phagocytose, — au point de vue de l'immunité active aussi bien que passive — en narcotisant l'animal immunisé, par une injection souscutanée d'opium, avant de lui injecter le *B. pyocyanique* dans le péritoine. La narcose obtenue par l'opium, comme cela ressort du travail de M. Cantacuzène, retarde la diapédèse, tout en conservant aux leucocytes leur sensibilité tactile et leur mobilité. Lorsqu'on prend deux cobayes du même poids, immunisés au même degré, — passivement ou activement, — et que l'on injecte à un d'eux sous la peau de la teinture d'opium (1 c. c.

pour 200 grammes d'animal). puis dans le péritoine une dose non mortelle pour eux du *B. pyocyanique*, on constate toujours que la réaction phagocytaire du cobaye narcotisé est moins prononcée que chez l'autre servant de témoin. Les bactéries demeuraient donc chez le cobaye narcotisé longtemps en dehors de cellules, elles se multipliaient, et bien que, la narcose terminée (après 4 à 5 heures), elles devenaient parfois toutes la proie des phagocytes, l'animal succombait. Ainsi, il suffit de retarder la diapédèse par l'injection de l'opium, de retarder l'apparition de la phagocytose, pour que l'animal perde son immunité, bien que les propriétés acquises par ses humeurs au cours de l'immunisation n'aient subi aucun changement.

Pour étudier le sort du *B. pyocyanique* sous la peau des animaux immunisés, nous nous sommes adressé à une chèvre et à des cobayes; la chèvre avait reçu pendant longtemps sous la peau des cultures vivantes; son sérum injecté sous la peau préservait, à la dose de 0,1 c. c., un cobaye de 300 grammes contre la dose sûrement mortelle du *B. pyocyanique*; quant aux cobayes vaccinés aussi avec des cultures vivantes, leur sérum était préventif dans les mêmes conditions à la dose de 0,05 c. c. à 0,1 c. c.

En injectant à nos animaux, sous la peau, le *B. pyocyanique* (une culture entière de 24 heures sous la peau de la chèvre, 1/40 à 1/20 de la culture aux cobayes), on voit déjà, dès les premiers moments, dans le liquide retiré du point d'inoculation, les bactéries immobilisées et en partie agglutinées. Les bactéries demeurent en dehors des cellules pendant 1 à 1/2 heure, en conservant leur aspect ordinaire ainsi que leur aptitude à se colorer. Les leucocytes sont peu nombreux, presque tous des mononucléaires; il n'y a pas de phagocytose.

Après 2 heures ou 2 heures et demie, les leucocytes commencent à affluer au point d'injection des bactéries et de les englober. Au bout de 3 heures, la phagocytose est déjà très accusée, on peut observer toutes les modifications ordinaires des bactéries, mais toujours à l'intérieur des leucocytes polynucléaires. Au bout de 10 à 15 heures, toutes les bactéries sont englobées par les polynucléaires, on ne voit plus de bactéries libres dans la goutte pendante. Celle-ci, étant mise à l'étuve, donne lieu au

développement de colonies ayant pour origine les bactéries englobées par les leucocytes.

Une partie des leucocytes affluant au point d'injection du *B. pyocyanique* subit tout d'abord, tant que tous les microbes ne sont pas englobés, les modifications que nous avons signalées lorsqu'on inocule les cobayes dans le péritoine, c'est-à-dire ils perdent leurs mouvements amiboïdes et se transforment en globules transparents. Au point d'injection on constate, au bout de 24 heures, une petite induration; au bout de 48 heures, un abcès. Sur des préparations colorées faites avec une goutte de cet abcès, on ne constate plus de microbes, et cependant, ensemençé dans des milieux nutritifs, son contenu donne des colonies du *B. pyocyanique* encore pendant assez longtemps, pendant 15 jours, par exemple, chez notre chèvre.

Nous n'avons donc jamais pu observer la destruction extracellulaire des bactéries lors d'injections sous-cutanées : cette destruction se faisait par contre à l'intérieur des cellules pendant la réaction phagocytaire de l'organisme. Nous avons pu constater ceci aussi par une autre voie, notamment en faisant des coupes de parcelles de peau et du tissu cellulaire sous-cutané au point où a été pratiquée l'inoculation.

Passons maintenant à une autre question. Les animaux à sang-froid — les grenouilles en particulier — sont-ils capables d'acquérir l'immunité active et passive, et, si oui, sur quoi cette immunité est-elle basée?

Je me suis servi des grenouilles vertes, — *rana viridis*. En les habituant peu à peu à la température de l'étuve, 30 à 37°, je pouvais tuer après cela, avec 1/40 de la culture de 24 heures sur gélose, une grenouille de 15-18 grammes en 16 à 24 heures; à l'autopsie, on trouvait des bactéries dans tous les organes aussi bien que dans le sang du cœur. Pour tuer une grenouille à la température ordinaire, il a fallu des doses plus considérables, — 1/5 de culture. Nous avons remarqué, en plus, que les toxines étaient sans action sur elle, même à la dose de 2 à 3 c. c. tandis que 1 c. c. de cette toxine tuait un cobaye de 300 grammes dans les 24 heures.

En injectant tous les 4 à 7 jours, dans le sac lymphatique des grenouilles habituées au séjour à l'étuve à 30°, des doses considérables de cultures chauffées à 80°, on remarquait qu'au bout

d'un certain temps, 3 à 4 semaines, les grenouilles devenaient plus résistantes à l'égard de notre bacille que le témoin placé dans les mêmes conditions; les grenouilles acquéraient donc un certain degré d'immunité; mais celle-ci était la plupart des cas assez faible. Une grenouille immunisée pouvait bien supporter une dose sûrement mortelle ou bien une dose et demie, mais succombait à la suite d'une dose deux fois mortelle. De plus, lorsqu'on injectait, à une grenouille accoutumée à 30-31°, du sérum préventif dans le sac lymphatique pour lui conférer l'immunité passive, nous avons remarqué ceci : quand le sérum a été injecté en même temps (2-3 c. c.) que la dose mortelle, ou 2 à 4 heures avant la culture pyocyannique, la grenouille, loin de devenir plus résistante, succombait quelquefois même plus rapidement que le témoin.

Le sérum préventif, injecté 24 heures avant la dose mortelle, donnait des résultats irréguliers. Les résultats étaient plus favorables lorsque le sérum était injecté 48 heures avant; dans ce cas, on pouvait constater une certaine immunité. Ainsi, en injectant, dans le sac lymphatique d'une grenouille de 16 grammes, 0, 3 c. c. de sérum préventif (ce sérum préservait un cobaye de 300 grammes à la dose de 0, 2 c. c. en injection sous-cutanée contre une dose une fois et demie mortelle injectée 24 heures après dans le péritoine), on la préservait contre 1/30 de la culture qui tuait dans les mêmes conditions le témoin déjà à la dose de 1/40 dans les 24 heures. Nous pourrions donc conclure que la grenouille est capable d'acquérir à un certain degré l'immunité active et passive vis-à-vis du *B. pyocyannique*, mais que celle-ci se développe chez elle lentement.

Voyons maintenant sur quoi est basée sa résistance naturelle aussi bien que sa résistance acquise, qu'il s'agisse de l'immunité active ou passive.

Remarquons tout d'abord que le liquide lymphatique de la grenouille, neuve ou immunisée, présente *in vitro* un milieu de culture excellent pour le *B. pyocyannique*. Au cours de l'immunisation, ce liquide acquiert la propriété *in vitro* d'agglutiner le *B. pyocyannique*, mais assez faiblement (1 : 20-1 : 30).

Nous avons pu nous assurer que l'agglutination seule, au cours de l'immunité passive, n'est d'aucune utilité pour la grenouille. En effet, en injectant à une grenouille, dans le sac

lymphatique, une dose simplement mortelle déjà agglutinée dans une quantité considérable de sérum préventif de chèvre (dont le pouvoir agglutinant était 1 : 1000), on déterminait la mort, et quelquefois plus rapidement que chez le témoin. Il faut par conséquent d'autres éléments que l'agglutination pour que la grenouille devienne plus résistante.

Lorsqu'on injecte à une grenouille, neuve ou vaccinée, dans le sac lymphatique, une dose non mortelle du bacille pyocyanique, et que l'on retire de temps à autre une goutte du liquide lymphatique, voici ce qu'on observe. Dans les premiers moments, la plupart des bactéries se trouvaient en dehors des cellules en conservant bien leur forme, sans se transformer en granulations; très rapidement elles se répandaient dans tout le corps à l'aide du système lymphatique; une partie des bactéries se colorait déjà dès les premiers moments en rouge par l'éosine, et ce phénomène était parfois très prononcé; mais il n'était pas en raison directe de la résistance que présentait la grenouille vis-à-vis du microbe, car il présentait le même caractère chez la grenouille neuve ainsi que chez la vaccinée.

On constatait le même phénomène en dehors de l'organisme, en mélangeant le sérum (provenant du liquide lymphatique) dépourvu de leucocytes, avec une culture pyocyanique de 24 heures. Très rapidement, déjà dans les premiers moments qui suivent l'inoculation, quelques phagocytes commencent à englober les bactéries, qui subissent à leur intérieur les changements habituels, c'est-à-dire prennent mal les couleurs et d'une façon inégale, et se transforment en boules.

Plus tard, la réaction phagocytaire s'accroît, et au bout de 15 à 20 heures toutes les bactéries se trouvent déjà à l'intérieur des cellules. Nous avons pu nous assurer, par le procédé ordinaire, que les bactéries ont été englobées à l'état vivant. Puis, les leucocytes contenant des bactéries deviennent de plus en plus rares, et déjà 48 heures après l'inoculation on ne voit plus de bactéries ni en dedans ni en dehors des cellules.

Cependant, lesensemencements faits avec le liquide lymphatique donnaient encore longtemps des colonies, jusqu'à 45 à 48 jours après.

Faisons remarquer que nous n'avons pas observé chez les grenouilles la dégénérescence des leucocytes que nous avons

décrite chez les cobayes lors de l'infection pyocyannique. Les grenouilles succombaient à l'inoculation du bacille pyocyannique sans que leurs leucocytes aient perdu leurs mouvements amiboïdes ou leur aspect extérieur normal.

Nous voyons donc que la résistance de la grenouille vis-à-vis du bacille pyocyannique se traduit de la même façon que chez les animaux à sang chaud, c'est-à-dire par la réaction phagocytaire de l'organisme.

CONCLUSIONS

1) Au cours de l'infection pyocyannique, on observe chez les cobayes un changement d'aspect extérieur et une dégénérescence des leucocytes se trouvant en contact avec les bactéries dans l'organisme; le phénomène est le même, qu'il s'agisse des animaux neufs ou vaccinés.

On peut le constater aussi *in vitro*, en dehors de l'organisme, en mélangeant des leucocytes avec la culture du bacille pyocyannique. Le sérum des animaux immunisés, soit préventif, soit antitoxique, n'empêche point ce changement des leucocytes de se faire en dedans ou en dehors de l'organisme.

2) Le pouvoir agglutinant du sérum, apparaissant au cours de l'immunisation, ne présente pas de parallélisme avec le pouvoir préventif.

3) La faculté du bacille pyocyannique, ensemencé en milieu purement albuminoïde, de donner parfois au bout d'un certain temps le pigment bleu, tient très probablement à son pouvoir peptonisant. Le sérum de certains animaux acquiert, au cours de l'immunisation, la propriété d'empêcher ce bacille de peptoniser l'albumine. Mais cette propriété du sérum n'est pas spécifique, n'a pas de rapports directs avec son pouvoir préventif ni avec la résistance que présente l'animal immunisé vis-à-vis du bacille en question.

4) Le sérum des animaux vaccinés contre le bacille pyocyannique ne possède pas *in vitro* de propriétés bactéricides appréciables. Nous n'avons pu non plus constater ces propriétés dans le corps des animaux vaccinés.

5) Chez les animaux bien immunisés contre le bacille pyocyannique, la destruction de celui-ci sous la peau, aussi bien que dans la cavité péritonéale, s'accomplit à l'intérieur des phagocytes.

Nous n'avons jamais constaté chez ces animaux la destruction extracellulaire, comme c'est le cas dans le choléra (phénomène de Pfeiffer).

6) Lorsqu'on injecte des cultures du bacille pyocyanique dans le péritoine des cobayes, la lutte entre les phagocytes et les bactéries se passe d'abord dans le liquide péritonéal; quand toutes les bactéries libres sont englobées, elles sont transportées dans le tissu cellulaire sous-péritonéal, où elles subissent la destruction ultérieure par les éléments cellulaires.

7) Chez tous nos animaux, immunisés et neufs, la résistance vis-à-vis du bacille pyocyanique s'est toujours traduite par la réaction phagocytaire de leur organisme. Le sérum préventif avait pour effet de favoriser l'apparition de cette réaction.

8) La grenouille est capable d'acquérir l'immunité active et passive, mais cette immunité se développe lentement et est peu prononcée.

9) La destruction du bacille pyocyanique chez la grenouille s'effectue comme chez les animaux à sang chaud, c'est-à-dire à l'aide des éléments phagocytaires de l'organisme.

*
* *

En terminant notre travail, nous tenons à cœur d'exprimer notre vive reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff, pour le sujet d'études qu'il nous a proposé, ainsi que pour les conseils qu'il nous a prodigués au cours de nos recherches.

-
1. WASSERMANN, *Zeitsch. f. Hyg.* 1896, Bd. 22.
 2. CHARRIN, *Comptes rendus de la Soc. de Biolog.* 1890.
 3. KREHL et SOETBIER, *Archiv. f. exp. Pathol.* 1898. Tome XL. p. 225.
 4. VAN-DE VELDE, *La Cellule*, 1894. Tome X (?).
 5. GESSARD, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.
 6. DENYS, *La Cellule*. Tome XI.
 7. CANTACUZÈNE, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, n° 4.
-

ÉTUDES SUR LA PESTE BOVINE

PAR MM.

NICOLLE

Directeur de l'Institut impérial
de bactériologie de Constantinople.

ADIL-BEY

Chef de laboratoire.

PREMIER MÉMOIRE

On sait que, de temps immémorial, la peste bovine fait les plus grands ravages dans l'Empire ottoman. Son Excellence Sélim Pacha Melhamé, ministre de l'Agriculture, justement ému par les pertes considérables que le typhus contagieux occasionne encore à l'heure actuelle dans de nombreux vilayets, nous a chargés en 1897 d'étudier cette importante question. Nous nous sommes immédiatement mis à l'œuvre, et nous avons continué nos recherches depuis cette époque. Des travaux importants, notamment ceux de MM. Kolle et Turner, ont paru pendant le cours de nos expériences. Nous y avons trouvé d'utiles indications.

Dans le présent mémoire, nous relatons un certain nombre de faits d'ordre expérimental. L'histoire de diverses épidémies, qui ont sévi en 1897 et 1898 et qui sévissent encore soit en Europe, soit en Asie, sera rapportée en détail par le Dr Réfik-Bey et le vétérinaire Réfik-Bey, chargés, par l'un de nous, de diriger l'application en grand du traitement sérothérapique.

Qu'il nous soit permis de remercier ici S. E. Sélim Pacha pour l'intérêt qu'il nous a témoigné depuis le début de nos recherches. Grâce à son intervention, nous sommes certains que la lutte contre la peste bovine, qui a déjà donné les meilleurs résultats, prendra de jour en jour une plus grande extension.

SYMPTOMES ET LÉSIONS DE LA PESTE BOVINE INOCULÉE

Lorsqu'on inocule un produit virulent, quel qu'il soit, par un mode quelconque, à un bovidé *de race sensible* — la dose pouvant être très faible — on observe constamment l'apparition d'une maladie cyclique, remarquablement semblable à elle-même, et rappelant de tout point les allures des fièvres éruptives.

Dans ces conditions expérimentales, on a donc l'impression d'un virus fixe qui tue à échéance déterminée. C'est là une ressource précieuse, puisque, connaissant la durée de l'incubation et l'évolution des symptômes, on se trouve à même de dépister les erreurs qui pourraient survenir au cours des recherches, et d'aborder, d'après un schème parfait, toutes les tentatives possibles de vaccination et de traitement.

La fièvre, premier signe de l'affection, apparaît du 4^e au 6^e jour, d'ordinaire le 5^e. La température s'élève (en général brusquement) à 40°,5, 41° et même davantage. A ce moment l'animal semble encore absolument normal. Nous n'avons jamais noté d'incubations inférieures à 3 jours pleins, comme certains auteurs en signalent. On est en droit de se demander à ce propos si — dans certains cas au moins — les animaux inoculés n'avaient pas été déjà accidentellement contaminés. On sait en effet de quelles précautions minutieuses il faut s'entourer quand on veut éviter les infections accidentelles. Nous n'en avons observé, pour notre part, qu'au début de nos recherches, alors que notre installation était par trop sommaire; depuis, elles ont disparu complètement, grâce à une surveillance constante.

Le 6^e ou le 7^e jour, apparaissent l'inappétence et, le plus souvent, la constipation. Le 7^e ou le 8^e jour, l'inappétence augmente et les signes caractéristiques se manifestent. L'animal est triste, les poils se hérissent, les yeux larmoient, une salive abondante s'écoule de la bouche. Si l'on examine alors la muqueuse buccale, on constate, au collet des incisives, un liséré congestif, et, sur la face interne de la lèvre inférieure, de fines élevures, miliaires, blanchâtres.

Le 8^e ou le 9^e jour, l'état général s'aggrave. Les oreilles restent tombantes, l'animal est abattu, indifférent et réagit mal aux incitations extérieures. Il grince fréquemment des dents et tousse par moments. Les reins sont sensibles à la pression; des tremblements musculaires se montrent au niveau des flancs et des muscles olécraniens. L'anorexie est désormais complète, même pour les boissons. Dans la bouche, les élevures sont devenues confluentes, l'épithélium qui les revêt se convertit par places en un détritüs pultacé qui laisse, en s'éliminant, des érosions irrégulières à odeur fétide et à fond saignant, érosions

dont l'ensemble donne à la région malade un aspect à la fois rongé et macéré.

La conjonctive s'injecte ; les larmes, d'ordinaire mucopurulentes, coulent en abondance, agglutinant les poils du chanfrein. Un jetage, également mucopurulent, s'établit, déterminant des ébrouements. Enfin, la constipation fait place à une diarrhée intense, alimentaire, puis séreuse et souvent sanglante, d'une fétidité marquée.

Le 9^e ou le 10^e jour, la température, qui s'était maintenue autour de 41° sans rémissions notables, commence à s'abaisser au-dessous de 40°. L'animal reste couché ; la stupeur et la faiblesse sont extrêmes, l'aspect général tout à fait misérable. La diarrhée, profuse et incessante, épuise l'organisme. L'émaciation, jusqu'alors modérée, progresse maintenant à vue d'œil. On entend des gémissements fréquents. L'hypothermie s'accuse de plus en plus, et la mort arrive du 10^e au 11^e jour, rarement plus tard.

Jamais, dans la peste inoculée des races sensibles, nous n'avons observé de guérison. Toujours, au contraire, la maladie a revêtu la forme rapide et cyclique qui vient d'être esquissée. De nombreux passages n'ont rien changé à la symptomatologie.

Signalons, comme raretés, l'ictère, le melœna, les érosions de la face interne des joues, de la langue, du palais, du mufle et de la vulve. L'emphysème sous-cutané a constamment fait défaut.

A l'autopsie, on retrouve les lésions buccales dont nous avons parlé. La pituitaire est congestionnée, parfois semée de pétéchie. Dans la caillette, on constate de la congestion (le plus souvent accompagnée d'un piqueté hémorragique), des taches purpuriques, des érosions et des altérations des follicules clos. Les taches représentent l'origine habituelle des érosions ; elles affectent la même forme irrégulière, et rien n'est plus fréquent que de rencontrer tous les termes intermédiaires entre une ecchymose et une perte de substance, parfois très profonde. C'est donc par ramollissement des pétéchie que se forment ces ulcères, tantôt linéaires (en coup d'ongle), tantôt polygonaux, jamais arrondis ou festonnés, si caractéristiques de la peste bovine. Leur étendue peut atteindre un centimètre carré et plus.

Leurs bords, taillés à pic, sont entourés d'une auréole hémorragique; leur fond, pultacé tant qu'il reste encore trace de la muqueuse, devient absolument sec lorsqu'il correspond à la couche musculaire. A côté de ces lésions ulcéreuses, on en trouve parfois d'autres qui succèdent à l'infiltration des follicules clos. Les organes lymphoïdes peuvent en effet se tuméfier, se ramollir et se transformer finalement en érosions arrondies ou ovalaires très profondes; le cas est assez rare. Les altérations de la cailllette offrent toujours une confluence et une intensité particulière dans la zone pylorique.

L'intestin grêle est congestionné; on y voit souvent un granité hémorragique et même des taches pourprées, mais les ulcérations et les lésions des follicules sont peu communes. Dans le gros intestin, toutes ces altérations se rencontrent encore moins fréquemment.

La rate n'est *jamais* hypertrophiée.

Le foie, congestionné, revêt un aspect spécial, facile à reconnaître quand on l'a vu une fois, mais assez malaisé à décrire. La surface de section, débarrassée du sang qui la souille, apparaît lisse, violacée, avec un reflet vert jaunâtre. Elle est demi-transparente, et ce caractère, joint à l'existence du reflet brillant, évoque l'idée d'un moulage en cire. La vésicule biliaire est remplie d'un liquide abondant, le plus souvent jaune verdâtre, clair, à peine filant. Les reins sont congestionnés. Les poumons montrent un emphysème discret des lobes antérieurs.

Le sang, recueilli à l'autopsie, ou même dans le stade hypothermique, se coagule lentement et incomplètement.

Nous étudierons dans un autre travail les lésions histologiques de la peste bovine inoculée.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Sensibilité des diverses races. — Nous avons inoculé comparativement des bovidés appartenant aux espèces les plus communes en Turquie. Les races de Crimée, d'Odessa, d'Alep, d'Égypte, d'Anatolie (races noires) sont très sensibles; chez elles l'infection est *constamment* suivie de mort. La race grise de Roumélie (identique à celle, bien connue, des steppes) se montre, au contraire, moins réceptive, ou plutôt moins régulièrement

réceptive. A côté d'animaux qui succombent dans les délais ordinaires par inoculation, ou même par simple cohabitation avec des bovidés malades, on en trouve d'autres qui résistent ou présentent des formes curables. Nos observations sont donc parfaitement d'accord avec celles de Semmer et des autres auteurs. Les races mixtes (race grise et race de Crimée — race grise et race noire) sont parfaitement sensibles.

Il va sans dire que si les bovidés des steppes peuvent être

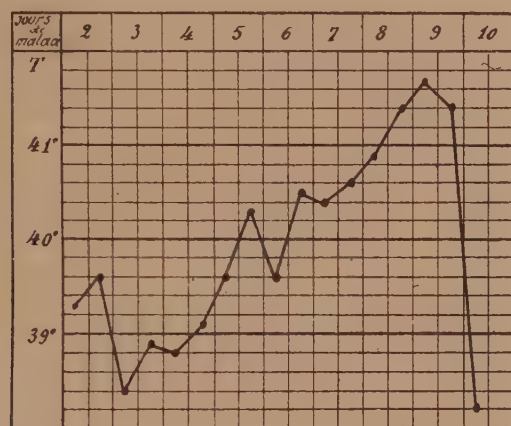


Fig. 1. — Race de Crimée, 3 ans. Injecté avec une goutte de sang sous la peau. Peste type, lésions types.

avantageux pour la préparation du sérum, ils sont absolument à rejeter dans toutes les expériences précises. Ce qui suivra — à moins d'une indication spéciale — se rapporte donc à l'inoculation d'animaux sensibles.

Nous n'avons pas encore fait des recherches sur les buffles, qui sont fréquemment atteints lors des épidémies.

Produits virulents. — Tout est virulent : humeurs, viscères, déjections; c'est là une notion classique. Le sang infecte constamment les sujets sensibles à la dose d'une goutte. Dans un seul cas, nous avons inoculé un millième de centimètre cube; l'animal a résisté, mais n'a point acquis l'état réfractaire. Dès le début de la fièvre, le sang contient le virus. Il le contenait encore le quinzième jour chez un bovidé gris en voie de guérison.

Si l'on filtre le sang, défibriné et étendu au dixième, sur le

filtre Chamberland ou sur la bougie Berkefeld, le liquide obtenu se montre inoffensif, mais il ne vaccine pas. L'humeur aqueuse, la sérosité céphalo-rachidienne se comportent de même.

Modes divers d'inoculation. — On infecte aisément les animaux par les divers modes : inoculation sous-cutanée; intra-veineuse, intrapéritonéale, intratrachéale,badigeonnage

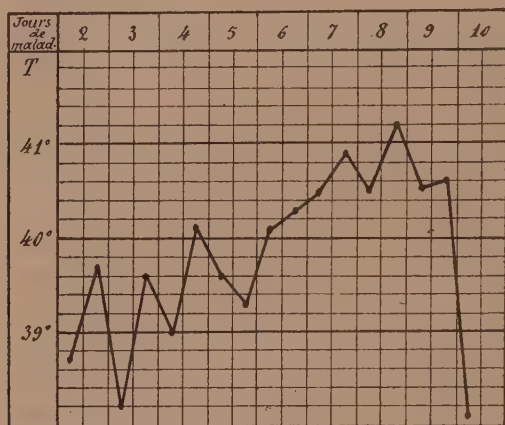


Fig. 2. — Race de Crimée, 2 ans. Injecté avec 4 litres de sang, en 6 points sous la peau. Signes classiques, lésions classiques.

des muqueuses avec le sang ou les déjections; cohabitation.

Quelles que soient la voie choisie et la matière inoculée, le résultat ne varie point. L'injection d'une trace de virus à l'extrémité de la queue tue dans les délais habituels. Des passages, déjà nombreux, ne se sont encore traduits par rien de saillant.

Influence des doses. — Lorsqu'on dépasse, par injection dans le tissu cellulaire, la dose sûrement mortelle, on ne change rien ni à la durée ni aux caractères de l'affection expérimentale. L'inoculation de dix, cent, mille, quatre mille centimètres cubes de sang donne identiquement les mêmes résultats que l'inoculation d'une goutte. Il suffira, pour s'en convaincre, de comparer les deux courbes suivantes (fig. 1 et 2).

Résistance du virus. — Le sang, défibriné ou non, et conservé dans une pipette sous un faible volume, perd rapidement son activité. Il est devenu inoffensif après six à sept jours à la glacière, après trois à quatre jours à la température de l'été. Le sang, défibriné ou citraté (à 3 pour mille), sous le volume de

200 c. c. demeure virulent pendant 12 jours au moins à 15°-18°.

Si l'on incorpore 1 c. c. de sang défibriné à 5 c. c. de gélatine, et si l'on met à la glacière, le mélange est encore infectieux après 32 jours à la dose de 2 c. c.; il est inactif après 60 jours

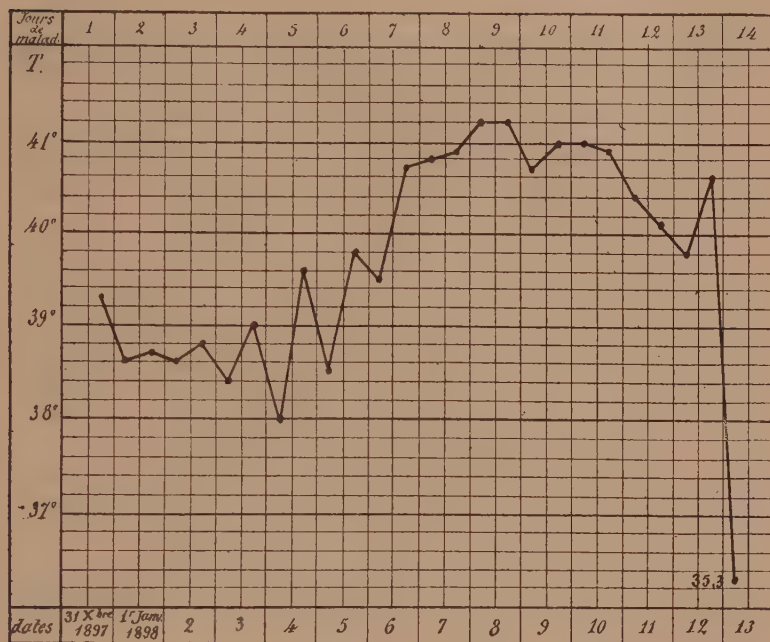


Fig. 3. — Chèvre race de Malte, 32 kil. — Inoculée, sous la peau, avec 0,25 c. c. de sang virulent. — Le 8^e jour, abattement, anorexie. — Le 11^e jour, diarrhée fétide, état comateux. — Le 14^e jour, mort dans l'algidité. — Congestion de l'intestin, foie en cire, vésicule biliaire distendue, bile jaune clair, liquide. Rate normale.

(même dose). Le sang, réparti dans la gélatine, et placé à l'étuve, cesse d'être virulent après 4 à 6 jours.

Les sels de quinine paraissent sans action sur le virus.

Inoculations aux animaux de laboratoire. — Le pigeon, le lapin, le cobaye sont absolument réfractaires. L'injection de phloridzine ne permet pas de vaincre l'immunité du cobaye. Si l'on inocule 5 c. c. de sang virulent dans le péritoine d'un lapin ou d'un pigeon, le sang de ces animaux, prélevé le cinquième jour et injecté aux bovidés (à la dose de 5 c. c.), ne leur donne ni la peste ni l'immunité.

Inoculations au mouton. — En employant divers modes ou artifices d'inoculation, en faisant usage de doses *énormes*, on détermine simplement (et encore pas toujours) une élévation thermique sans phénomènes généraux. Si l'on injecte sous la peau d'un mouton 50 c. c. de virus, et si, le cinquième jour, on inocule 5 c. c. du sang de ce mouton à un veau, celui-ci peut mourir dans les délais ordinaires ou avec un retard (par exemple en 24 jours); il peut aussi contracter une affection curable. Le passage par le mouton n'augmente donc pas la virulence, au moins dans les conditions où nous avons expérimenté. Les animaux qui nous ont servi appartenaient à la race asiatique et à la race à grosse queue.

Inoculation à la chèvre. — La chèvre est certainement sensible; du moins succombe-t-elle dans la majorité des cas. Les symptômes observés sont la fièvre et l'émaciation progressive. La mort survient en 9 à 60 jours. Les femelles pleines avortent constamment. Une seule fois nous avons noté de la diarrhée, coïncidant avec la courbe thermique typique (fig. 3).

Nous sommes convaincus qu'avec certaines races, et aussi avec certains virus, on pourra réaliser sûrement l'infection classique.

Le sang des chèvres inoculées a donné au veau une affection tantôt mortelle, tantôt curable; il a parfois donné de la fièvre à d'autres chèvres.

Nous avons expérimenté sur la race d'Anatolie et sur celle de Malte.

PESTE BOVINE ET FIÈVRE DU TEXAS

Dans un travail spécial, nous étudierons la fièvre du Texas (mieux nommée, par Celli et Santori, « malaria des bovidés »), affection très répandue en Turquie, mais d'ordinaire latente. A cet égard il convient de séparer nettement les animaux *importés* des animaux *indigènes*. Les premiers sont parfois atteints de malaria type, sous forme sporadique ou épidémique. La maladie n'est pas fréquente, et, le plus souvent, on la confond avec la fièvre charbonneuse qu'elle simule assez bien pour l'observateur non prévenu (urines rouges; mort subite, ou presque, dans certains cas; rate grosse; sang fluide et noir). Les seconds ne

montrent les signes caractéristiques de la fièvre du Texas que lorsqu'ils sont atteints de peste bovine. C'est donc uniquement au cours des épidémies de typhus contagieux ou dans les expériences de laboratoire qu'on peut constater la malaria des sujets indigènes.

Malgré de nombreux examens microscopiques, nous n'avons jamais pu rencontrer l'agent pathogène — le *pirosoma bigem-*

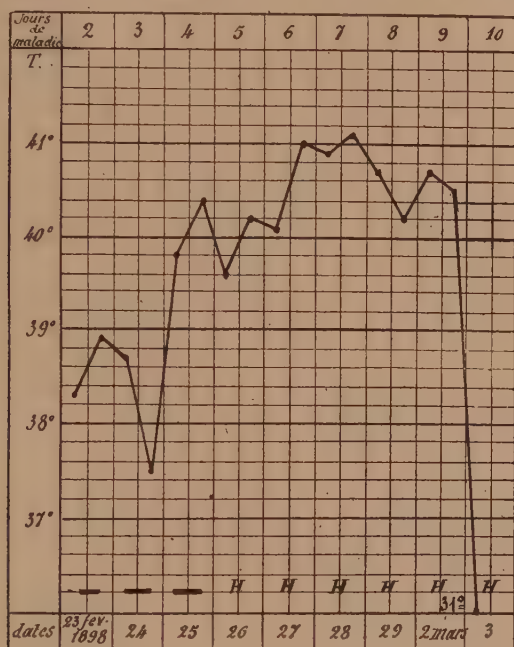


Fig. 4. — Race de Crimée, 1 an. — Inoculé dans les veines avec 1/10 c. c. de virus mixte. — Peste bovine classique. — Ni symptômes ni lésions de malaria. — Hématozoaires pendant la vie (H); après la mort, dans le sang et les viscères.

mum — dans le sang des animaux sains ou paraissant tels. Au contraire, ce parasite se manifeste avec une excessive fréquence après inoculation de virus mixte ou de virus pur.

Inoculation de virus mixte. — Nous appelons virus mixte tout sang pesteux qui contient des hématozoaires. Peu importe que l'animal dont il provient aie ou non des symptômes malariques.

Lorsqu'on inocule ce virus, on transmet à la fois la peste bovine et le *pirosoma*. Mais, tandis que la peste se révèle par tous ses signes, l'hématozoaire ne produit ordinairement aucun

trouble appréciable. On le rencontre dans le sang, à partir du quatrième jour au plus tôt, et voilà tout. (Voir la courbe de la fig. 4.)

De temps en temps cependant, l'organisme malarique trahit son existence par une fluidité spéciale du sang, qui noircit rapidement après la mort. Enfin, chez trois animaux, nous avons vu les manifestations bien connues de la fièvre du Texas — hémoglobinurie, anémie suraiguë, dyspnée intense — compliquer la peste bovine. A l'autopsie, la rate était hypertrophiée, le foie granuleux et d'un jaune plus ou moins vif, lésions qui tranchaient par leur caractère insolite sur les altérations concomitantes du typhus contagieux.

Quand on inocule le virus mixte à des bovidés gris, ceux-ci peuvent résister à la peste et montrer simplement des hématozoaires pendant 3 à 12 jours. Leur sang, inoffensif pour un animal indigène, peut donner une maladie grave, parfois mortelle, à un sujet importé. Nous avons fait l'expérience sur des bovidés de même race (Crimée); les uns nés en Turquie se montrèrent quasi-réfractaires, les autres venus de Russie, très réceptifs. Notre observation confirme donc pleinement celle de tous les auteurs qui ont écrit sur la fièvre du Texas.

Un veau de Crimée, qui avait reçu du sang malarique, présentait une fébricule bénigne et des parasites du huitième au seizième jour. Inoculé, trois mois après, avec du virus pesteux pur, il succomba au typhus contagieux en présentant des hématozoaires. Ceux-ci s'étaient donc conservés à l'état latent dans son organisme. Voilà un fait qui explique aisément ceux qui vont suivre.

Inoculation du virus pesteux pur. — Nous appelons ainsi : l'infection par le sang dépourvu de pirosoïdes, par l'humeur aqueuse ou le liquide céphalorachidien des sujets morts de peste avec ou sans hématozoaires; par le sang des chèvres et moutons qui ont reçu du sang pesteux pur ou non; enfin, par cohabitation.

Dans ces diverses conditions expérimentales, il arrive très souvent qu'on voit apparaître le pirosoïde en même temps que les signes du typhus. D'ordinaire, aucun symptôme malarique ne se produit; parfois le sang devient fluide et noir comme il a été dit plus haut; dans deux cas les manifestations de la fièvre du Texas associée furent des plus marquées.

Quand on inocule le virus pur à des animaux des steppes, ils

peuvent résister à la peste bovine et montrer des hématozoaires transmissibles par inoculation. Ce résultat, paradoxal en apparence, et qui surprend fort au début des recherches, prouve (mieux encore que les autres expériences relatées dans ce chapitre) que le virus pesteux joue vis-à-vis du virus malarique le rôle d'un véritable agent révélateur. D'autres affections possèdent-elles ce singulier pouvoir? Nous l'ignorons absolument.

Comme conclusion *pratique*, nous dirons qu'il est impossible ici de se procurer à coup sûr du virus pesteux pur, quelles que soient les précautions dont on s'entoure. Tant d'animaux recèlent des hématozoaires latents, que le piroplasma se rencontre incessamment au cours des expériences. Nous avons dû, par conséquent, nous servir souvent du virus mixte pour immuniser et hyperimmuniser les bovidés. Il n'en est résulté d'ailleurs aucun inconvénient. Certains animaux ont parfaitement supporté des doses *énormes* de sang malarique, mais — soit dit en passant — leur sérum n'a acquis *aucun pouvoir préventif* (et encore moins curatif) vis-à-vis de l'hématozoaire.

IMMUNITÉ CONTRE LA PESTE BOVINE

Immunité en général. — Les animaux guéris de la maladie naturelle possèdent, comme on le sait, une immunité solide et durable. C'est là un fait que nous avons constaté à maintes reprises.

Expérimentalement, bien des moyens ont été proposés pour créer l'état réfractaire. Les deux principaux consistent dans la vaccination par la bile et la sérothérapie.

La bile confère une résistance parfaite, mais assez peu durable. A cet égard nos recherches sont d'accord avec les faits déjà connus. Il est certain qu'avant l'emploi du sérum, la méthode de M. Koch constituait une précieuse ressource. Aujourd'hui on ne saurait y avoir recours qu'en l'absence d'autres moyens.

Il en est de même des procédés préventifs et curatifs qui utilisent le sérum des animaux *guéris*.

Aujourd'hui on fait appel exclusivement au sérum des animaux hyperimmunisés. C'est dans cet ordre d'idées qu'ont été entreprises les recherches, si intéressantes, de MM. Kolle et Turner.

Dès le début de nos expériences, nous savions déjà qu'en matière d'infection les *fortes doses* ne produisent pas plus d'effet que les doses minimales. Aussi avons-nous commencé à tirer parti de cette curieuse donnée pour l'hyperimmunisation des animaux. Le premier travail de MM. Kolle et Turner, qui indiquaient (sans grands détails du reste) qu'on peut injecter *progressivement* jusqu'à 4 litres de virus aux bovidés guéris, nous confirma dans notre manière de voir et nous encouragea à aller plus loin encore. Depuis ce moment nous avons fait un usage systématique des fortes doses, non pas progressivement, mais *brutalement*, et nous nous en sommes très bien trouvés.

C'est qu'en effet l'immunité des animaux guéris se montre pour ainsi dire *illimitée*. A peine sortis de la période fébrile, ils peuvent recevoir coup sur coup 4, 8, 10 litres de sang virulent; *jamais* on n'arrive à les tuer, quelle que soit leur race, quel que soit leur âge. Sur ce point notre pratique, déjà assez grande, nous permet d'être absolument affirmatifs (tout au moins pour ce qui concerne les bovidés de l'Empire ottoman et les virus que nous avons eus entre les mains).

Pouvoir préventif du sérum. — Ce pouvoir est facile à mettre en évidence, soit qu'on injecte le sérum puis le virus, soit qu'on emploie la méthode dite simultanée, soit enfin que l'intervention thérapeutique ait lieu pendant l'incubation.

1^o Sérum puis virus. — Expérimentalement, le sérum des animaux qui ont reçu 4 litres de sang pesteux s'est toujours montré préventif à la dose de 25 c. c. contre l'inoculation virulente pratiquée plusieurs jours après.

Lors des épidémies, les bovidés auxquels nous avons injecté la même dose de sérum ont été parfaitement protégés; pendant plusieurs semaines on a pu les soumettre impunément à divers modes d'infection.

Pour des raisons *toutes spéciales*, nous nous sommes contentés jusqu'ici du sérum comme unique moyen de vaccination en grand. Les résultats n'ont rien laissé à désirer, ainsi qu'on pourra en juger lorsque paraîtront les statistiques détaillées.

Mais nous savons fort bien que l'immunité passive s'évanouit après quelques mois. Aussi comptons-nous mettre en œuvre, au moment opportun, des méthodes susceptibles de créer un état réfractaire plus durable, par exemple le procédé simultané ou

d'autres, actuellement à l'étude. Nous pensons toutefois que, dans nombre de cas, il faudra continuer à employer le sérum seul, quitte à forcer les doses, ou même à réitérer les injections.

2° *Méthode simultanée.* — Sous ce nom, MM. Kolle et Turner ont préconisé un procédé qui consiste à injecter d'un côté de l'animal 0^{cc},5 à 1 c. c. de virus, et de l'autre une quantité de sérum variant selon la force de celui-ci. Le but qu'on se propose n'est point de supprimer l'infection, mais, bien au contraire, de produire une maladie légère caractérisée par de la fièvre et quelques phénomènes généraux sans gravité. Il faut donc faire usage d'un sérum d'activité connue, et injecter une dose soigneusement déterminée. Sinon il arrive, ou bien que l'animal ne montre aucune réaction — alors son immunité sera transitoire,

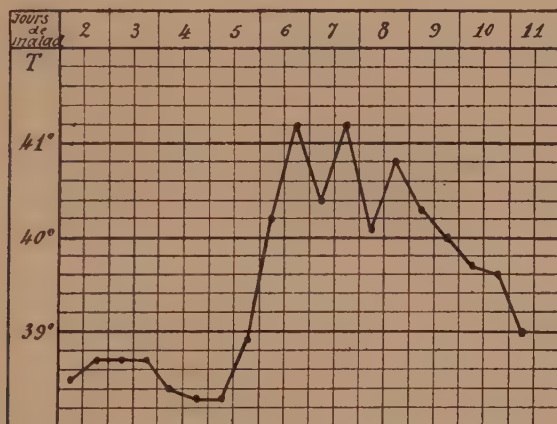


Fig. 5. — Race de Crimée, 3 ans. Inoculé d'un côté du corps avec 1 c. c. de sang virulent, de l'autre avec 25 c. c. de sérum. Fièvre seule.

— ou bien qu'il prend la peste bovine type — circonstance défavorable, malgré les chances de guérison par la sérothérapie.

Nous avons répété très souvent l'expérience de MM. Kolle et Turner. Le sérum des bovidés qui ont reçu 4 litres de virus s'est montré, ici encore, actif à la dose de 25 c. c. Quelle que fût la race, quel que fût l'âge de l'animal, les signes classiques de la peste bovine n'ont jamais paru. Les sujets appartenant aux races sensibles ont présenté le plus souvent de la fièvre. (Voir la courbe (fig. 5). Lorsque celle-ci a fait défaut, les animaux ont pu néanmoins supporter, quelques jours après l'inoculation

simultanée, des doses énormes de virus. Les bovidés des steppes ne réagissent point d'ordinaire; ils deviennent cependant insensibles aux infections massives.

Si le virus, inoculé en même temps que le sérum, contient des hématozoaires, on constate la présence de ceux-ci à partir du 4^e jour (au plus tôt) et pendant quelques jours. Il n'occasionne aucun trouble. Les signes caractéristiques de la fièvre du

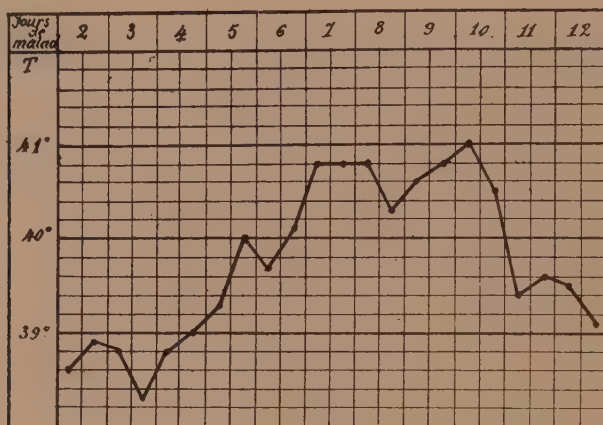


Fig. 6. — Race de Crimée. Inoculé sous la peau avec 1 c. c. de sang virulent. Reçoit le 4^e jour 50 c. c. de sérum. Fièvre seule. Le 17^e jour on injecte, impunément, 3,500 c. c. de virus. Le 19^e 3,200, en tout 6 litres 7. Un témoin, inoculé le même jour avec 1 c. c. du même sang, est mort en 10 jours.

Texas ne se manifestent que dans les cas où la dose de sérum n'a pas été suffisante. Ils apparaissent alors comme complication d'une peste bovine type. Le fait est rare, d'ailleurs.

Il est néanmoins indiqué, dans un pays comme le nôtre, d'éviter l'emploi du virus mixte pour la méthode simultanée. On peut tourner la difficulté en se servant du sang de mouton infecté, ainsi que le recommandent MM. Kolle et Turner; on peut la tourner bien plus simplement encore, comme nous le montrerons ultérieurement.

3^o *Virus puis sérum.* — Expérimentalement, le sérum, injecté avant l'apparition de la fièvre, se montre parfaitement actif; mais il faut élever la dose à 50 c. c., au moins à partir du troisième jour. L'affection se trouve alors réduite à une fièvre sans gravité. (Voir la courbe de la fig. 6.)

De même, lors des épidémies, on réussit aisément à sauver les animaux en état d'incubation.

Pouvoir curatif du sérum. — Pour guérir les sujets déjà malades, on doit injecter une quantité plus forte encore de sérum (au moins 100 c. c.). Les chances de réussite décroissent évidemment à mesure qu'on s'éloigne du début de la période fébrile. Elles sont nulles alors que la température commence à baisser, presque nulles quand la diarrhée est devenue abondante.

Non seulement dans le laboratoire (voir la courbe de la fig. 7), mais surtout au cours de diverses épidémies, nous avons eu l'occasion de traiter un certain nombre d'animaux malades. Le chiffre des guérisons a été très élevé; les observations seront publiées prochainement.

Comme les savants du Cap, nous avons constaté que l'injection *unique* d'une *forte dose* est bien préférable à la répétition de doses faibles ou même moyennes. Nous avons constaté de plus la supériorité de la voie intraveineuse sur la voie sous-cutanée. Enfin, nous considérons comme *indispensable* d'entourer des plus grands soins les animaux traités. Il faut les soustraire à l'influence du froid, les alimenter avec des barbotages, du thé de foin, au besoin même du lait. Le plus souvent on sera obligé d'introduire les liquides dans le fond de la bouche.

Les sujets, dont la peste bovine se complique de malaria, résistent à tout traitement (même si l'on emploie des doses *énormes* de sérum *mixte*); les sujets tuberculeux ne guérissent, sans doute, jamais. Dans le seul cas où nous avons sauvé un animal tuberculeux, celui-ci a succombé pendant la convalescence; il est vrai que les lésions bacillaires étaient exceptionnellement développées.

Sérum et virus mélangés. — Nous n'avons fait que peu de recherches sur ce point; elles n'ont pas encore donné de résultats satisfaisants au point de vue de la vaccination. MM. Kolle et Turner sont d'ailleurs arrivés à une conclusion analogue, à la suite d'expériences bien plus nombreuses que les nôtres.

Préparation du sérum. — Nous la considérons comme *extrêmement facile*. Sur une quarantaine d'animaux que nous avons hyperimmunisés, pas un n'a succombé, pas un n'a même présenté d'altérations sérieuses de la santé.

Pour obtenir le sérum, on peut s'adresser à des bovidés

guérés de la maladie naturelle ou immunisés par n'importe quel moyen. Quel que soit leur âge, quelle que soit leur race, il suffit de leur injecter en une fois, ou coup sur coup — selon la quantité de virus dont on dispose — 4 à 8 litres de sang pesteux.

Il est bien plus simple encore de pratiquer l'immunisation et l'hyperimmunisation en une seule séance. On injecte alors

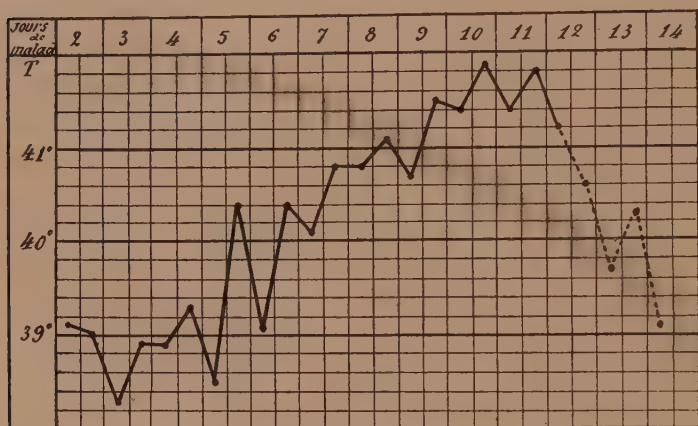


Fig. 7. — Race de Crimée, 3 ans. Inoculé, sous la peau, avec 1 c. c. de sang virulent. Le 12^e jour état très grave (anorexie, coryza, conjonctivite, stomatite, diarrhée). On injecte, le matin, 100 c. c. de sérum sous la peau. Le lendemain l'animal commence à manger. Peu de jours après la guérison est complète. Le 18^e jour on inocule, impunément, 4 litres de virus.

Un témoin, de *race grise*, inoculé le même jour, avec le même virus, est mort dans les délais normaux.

4 litres de virus et 25 c. c. de sérum ; 15 jours après, le sang de l'animal est devenu préventif à la dose de 25 c. c. Au lieu de 4 litres on peut en inoculer 8 ; le sang sera alors plus actif ; mais l'activité ne paraît pas croître en proportion de la dose de virus inoculée. Le procédé rapide qui vient d'être indiqué réussit admirablement avec la *race grise* : il semble réussir également quand on s'adresse à des animaux adultes des races sensibles, mais nos observations sont encore peu nombreuses pour ces derniers.

Quinze jours après l'injection virulente massive (ou après la dernière injection, si l'on a opéré en plusieurs séances) on saigne l'animal. Pendant 4 à 5 semaines, on continue à prendre du sang tous les 5 à 6 jours ; cela fait 6 saignées. Le sérum de la sixième

saignée ne diffère pas comme activité de celui de la première.

Tous les sérums des animaux qui ont reçu 4 litres de virus paraissent absolument de même force ; jamais nous n'avons constaté de différence appréciable. Toutefois, il est plus prudent de les mélanger et de les titrer exactement. Ce titrage peut se faire de diverses façons ; l'inoculation simultanée, préconisée par MM. Kolle et Turner, nous paraît la meilleure.

Après la sixième saignée, on injecte à nouveau 4 litres (ou plus) et l'on saigne au bout de 15 jours. Et ainsi de suite¹. Le sérum devient plus actif à mesure que l'animal est depuis plus longtemps soumis aux inoculations. Bien que certains du fait, nous ne pouvons donner de chiffres exacts à cet égard, parce que la plupart des animaux que nous possédions au début de nos recherches, et qui étaient de trop petite taille, ont été remplacés progressivement par des sujets plus volumineux.

Le sérum, additionné d' $\frac{1}{4}$ 0/0 d'acide phénique, se conserve parfaitement sans perdre ses propriétés thérapeutiques.

Il nous reste à dire quelques mots de la récolte du virus qui sert à l'immunisation. Après avoir infecté les animaux, on recueille leur sang au moment où commence l'hypothermie, c'est-à-dire le 9^e ou le 10^e jour (en général le 9^e). Le virus, ainsi obtenu, ne contient pas d'impuretés ; aussi peut-il être injecté à doses massives sans jamais produire d'abcès.

La saignée (à blanc) se pratique dans la carotide ; on reçoit le sang dans un bocal contenant une solution concentrée de citrate de potasse. Cette solution est calculée de telle façon que la proportion du sel anticoagulant atteigne 3 0/00. Le sang citraté remplace avantageusement le sang défibriné ; nous avons constaté qu'il donne exactement les mêmes résultats au point de vue de l'hyperimmunisation.

Nous rejetons absolument le sang des animaux qui ont présenté des signes de fièvre de Texas ; mais nous sommes obligés d'employer souvent du virus qui contient le piro soma. Bien que nous n'ayons jamais eu d'accidents, nous préférierions utiliser systématiquement comme virus le plasma du sang citraté. Lorsque nous posséderons les instruments nécessaires au centri-

1. A chaque série d'inoculations, les animaux réagissent par une élévation thermique sans gravité dont la durée, parfois très courte, ne dépasse jamais une dizaine de jours.

fugage en grand, nous pratiquerons donc toutes les inoculations avec le plasma. L'expérience nous a déjà montré qu'on hyper-immunise parfaitement les animaux de cette façon.

Inutile de dire que l'injection du sang pesteux doit se faire aseptiquement; la majorité des animaux résorbent ce sang en deux à trois jours; quelques-uns (toujours les mêmes) peuvent présenter, pendant une semaine au plus, une ou deux collections fluctuantes. Celles-ci contiennent un sang liquide, exempt d'impuretés, également incapable d'infecter et de vacciner les animaux.

Nichan Tach, janvier 1899.

PREMIÈRE NOTE SUR LA MALARIA DES BOVIDÉS

PAR MM.

M. NICOLLE

Directeur de l'Institut Impérial de bactériologie
de Constantinople.

ADIL-BEY

Chef de laboratoire.

Sous les noms d'hémoglobinurie du bœuf (Babes); de fièvre du Texas (Smith et Kilborne-Weisser et Maassen); d'hématinurie de Sardaigne (Sanfelice et Loi); d'hémoglobinurie de Finlande (Krogius et v. Hellens); de malaria des bovidés (Celli et Santori), etc., on désigne une seule et même affection, produite par le *Pirosuma bigemum*, parasite du groupe des hématozoaires. Observée à l'heure actuelle dans de nombreux pays, elle a fait l'objet de recherches réitérées, et les expériences récentes de M. Koch viennent de montrer quel intérêt s'attache à ce paludisme bovin, si voisin de la malaria humaine.

La plupart des auteurs admettent une forme aiguë et une forme lente. La première se traduit par de la fièvre, une anémie rapide, et, fréquemment aussi, par de l'hémoglobinurie. La durée est de 5 à 6 jours, parfois moins dans les cas pernicieux. La mortalité peut dépasser 50 0/0. A l'autopsie, on trouve la rate hypertrophiée, le foie congestionné, la bile abondante et épaisse. Les hémorragies des reins et des parois intestinales ne sont pas rares. La forme lente revêt l'aspect d'une fébricule plus ou moins prolongée, à allures bénignes. Elle peut même rester absolument latente; le diagnostic n'est alors possible que par l'examen du sang. Certains observateurs pensent que la malaria confère l'immunité, d'autres admettent des rechutes fréquentes. Dans beaucoup de pays, les animaux indigènes jouissent d'une immunité presque absolue; partout, les jeunes sujets se montrent très résistants. C'est précisément cette résistance des jeunes qui expliquerait l'état quasi-réfractaire des adultes, par suite d'une véritable vaccination.

La malaria règne surtout dans les contrées marécageuses;

on s'accorde, depuis les travaux de Smith et de Koch, à faire jouer aux insectes (tiques) un rôle presque exclusif dans la contagion.

L'affection n'est inoculable qu'aux bovidés. Si certains auteurs n'ont pu réaliser l'infection expérimentale, c'est sans doute parce qu'ils se sont adressés soit à des animaux indigènes, soit à des jeunes sujets, souvent aux deux.

Les divers savants qui ont étudié la peste bovine dans l'Afrique australe ont signalé comme fréquente la présence du *Pirosoma* dans le sang des animaux atteints du typhus contagieux naturel ou expérimental.

Nous avons fait, en Turquie, pareille constatation. *Lors des épidémies* de peste bovine, on rencontre très souvent le *Pirosoma* chez les animaux malades. Parfois il se traduit par des signes plus ou moins caractéristiques; mais, dans la majorité des cas, il reste latent. Ces faits seront mentionnés en détail dans un prochain mémoire du Dr Réfik Bey et du vétérinaire Réfik Bey.

Les rapports du *Pirosoma* et du virus pesteux, *au point de vue expérimental*, ont été déjà indiqués par nous (voir plus haut p. 326); inutile d'y revenir. Nous décrirons aujourd'hui l'histoire d'une petite épizootie de malaria bovine, observée à la fin de l'année 1898, en y joignant le résultat de quelques recherches de laboratoire concernant l'infection et l'immunisation malariques. Une note ultérieure sera consacrée à l'hématozoaire et aux lésions qu'il détermine.

*
* *

L'épizootie en question a sévi à Kutchuk-Tchiftlik (Constantinople) sur des vaches laitières *importées* de Crimée¹. 50 animaux sur 120 ont été atteints; 16 sont morts. Les sujets qui ont succombé étaient, pour un tiers, des vaches pleines; pour le reste, des bêtes le plus souvent âgées, tuberculeuses ou porteuses de lésions échinococciques étendues (foie et poumons). Les jeunes animaux ont été tous épargnés.

La maladie a revêtu trois formes : foudroyante, aiguë et légère; les deux premières constamment mortelles, la troisième toujours bénigne.

1. Nous avons montré, dans notre précédent travail sur la peste bovine, que, malgré la fréquence du *Pirosoma* chez les bovidés *indigènes*, ceux-ci semblent ne jamais être atteints de malaria à signes cliniques manifestes.

Forme foudroyante (4 cas). — Elle apparaît, comme son nom l'indique, sans aucun signe précurseur. L'animal, après quelques instants d'inquiétude, vacille, tombe, s'agite un peu et meurt. A l'autopsie, on trouve un hémopéritoine, des ecchymoses épiploïques et mésentériques, et une rupture de la rate.

Forme aiguë (12 cas). — Elle débute par de la fièvre (40°, 5-41°, 5), de l'inappétence, de la tristesse. La rumination est irrégulière et la sécrétion lactée diminue considérablement. Puis l'appétit disparaît; la station debout devient difficile, par suite d'un affaiblissement portant principalement sur les membres antérieurs; les muqueuses se décolorent.

La sécrétion du lait cesse; l'abattement augmente; on constate en général de la constipation, rarement un peu de ramollissement des matières fécales. Le poil est terne et piqué.

Les forces déclinent de plus en plus; la respiration devient brève et rapide; de la bouche s'écoule une salive abondante. Enfin, l'animal meurt dans le coma. Pendant les dernières heures, la température s'abaisse fortement.

C'est, en somme, l'image d'une anémie rapide et profonde. Chez deux animaux, nous avons vu l'affection se terminer par la mort subite (rupture de la rate).

La forme aiguë dure de 2 à 4 jours; dans les deux tiers des cas, elle s'accompagne d'une hémoglobinurie d'intensité variable; les urines sont tantôt rouge franc ou rouge brun, tantôt saumonées (lavure de chair). L'hémoglobinurie constitue parfois le premier signe de la malaria; d'ordinaire elle n'apparaît que le deuxième ou le troisième jour.

Les lésions de la forme aiguë peuvent se résumer ainsi : cadavre peu émacié; rate grosse, molle, diffluente; reins congestionnés; sang fluide, très pauvre en hématies, souvent clair, et même rosé; bile abondante et épaisse.

Le foie offre deux aspects différents (sans rapports visibles avec les signes observés); tantôt il est rouge brun, uniforme; tantôt il apparaît granuleux et jaune doré. Dans ce dernier cas, en examinant attentivement une section nette de l'organe, on trouve les lobules jaunes, à centre portal (invertis) et limités par des lignes d'un gris rosé qui correspondent aux veines et zones sushépatiques. Cette lésion est absolument caractéris-

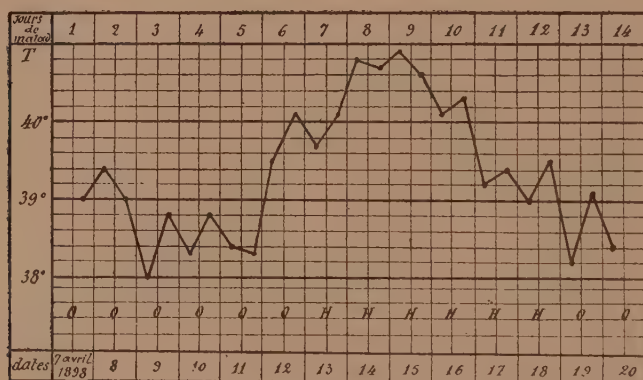
tique; quand on immerge des fragments dans le sublimé de Mayer, ils prennent une teinte vert-bronze.

Le tube digestif, les poumons, etc., sont sains. Dans les deux cas où l'affection s'était terminée par la mort subite, nous avons rencontré l'hémopéritoine et la rupture splénique.

Forme légère (34 cas). — Elle se traduit par de la fièvre, un peu de faiblesse, une émaciation modérée, de l'inappétence, de la diminution de la sécrétion lactée. Jamais on n'observe d'hémoglobinurie. La guérison survient rapidement.

Inutile de dire que l'hématozoaire s'est montré constant, quelle que fût la forme. A l'autopsie, on le trouvait dans le sang et les viscères. Le sang d'un fœtus de six mois ne renfermait aucun parasite.

En inoculant le virus malarique aux animaux *importés*, on reproduit aisément l'affection naturelle. Par contre, cette même inoculation ne détermine chez les bovidés *indigènes* qu'une fièvre



— Fig. 1. B. A. 8. Race de Crimée. — Inoculé dans les veines avec 0,01 c. c. du sang de B A 7 (voir plus bas) pris le 12^e jour. Fièvre seule. H, hématozoaires dans le sang. O, pas d'hématozoaires.

sans gravité. Il est curieux de comparer, à cet égard, la sensibilité des animaux de Crimée importés à la résistance des animaux de Crimée indigènes. C'est là un parallèle que nous avons eu souvent l'occasion de faire.

L'injection de sang malarique aux diverses races du pays

détermine presque toujours un mouvement fébrile et l'apparition du *Pirosoma* dans le sang. Nous avons vu, rarement il est vrai, des sujets jeunes résister complètement à l'infection hématozoïque expérimentale. La fièvre, sans caractère spécial, commence du cinquième au huitième jour et dure de 2 à 6 jours ; la température peut atteindre $41^{\circ},5$. Le *Pirosoma* se montre du quatrième au huitième jour et disparaît du huitième au seizième ; on le trouve presque quotidiennement dans le sang.

Voici deux exemples d'infection chez des animaux de Crimée autochtones (fig. 1 et 2).

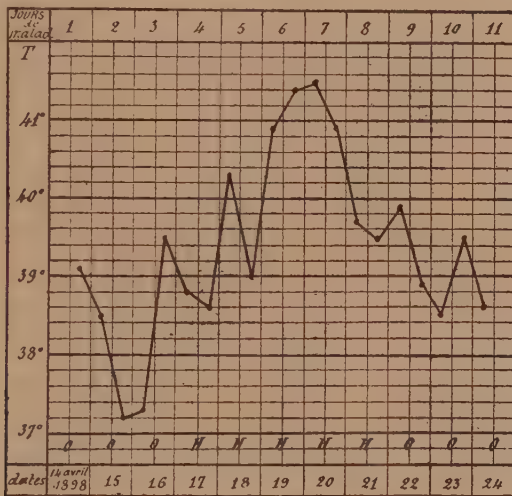


Fig. 2. B. A. 9. Race de Crimée, 1 an. Inoculé sous la peau avec 1 c. c. de sang de B. A. 8 pris le 8^e jour. Fièvre seule.

On voit qu'il est aisé de faire des passages, soit dans les veines, soit sous la peau, même en employant de très faibles quantités de sang virulent.

La malaria confère-t-elle l'immunité ? Pour les animaux importés, nous l'ignorons, n'ayant pas fait d'expériences à ce sujet ¹. Pour les bovidés indigènes, il s'agit plutôt, croyons-nous, d'une *tolérance* que d'une immunité véritable. Voici les raisons qui militent en faveur de cette manière de voir. Tout d'abord c'est la

1. Mais il n'y a aucune raison d'admettre qu'ils se comportent autrement que les animaux nés en Turquie.

fréquence du *Pirosoma* dans la peste bovine naturelle ou expérimentale (inoculation de virus pesteux pur), fréquence qui ne saurait s'expliquer qu'en admettant que nombre d'animaux renferment le *Pirosoma* à l'état latent.

Le parasite existe donc chez des bovidés, sains d'apparence,

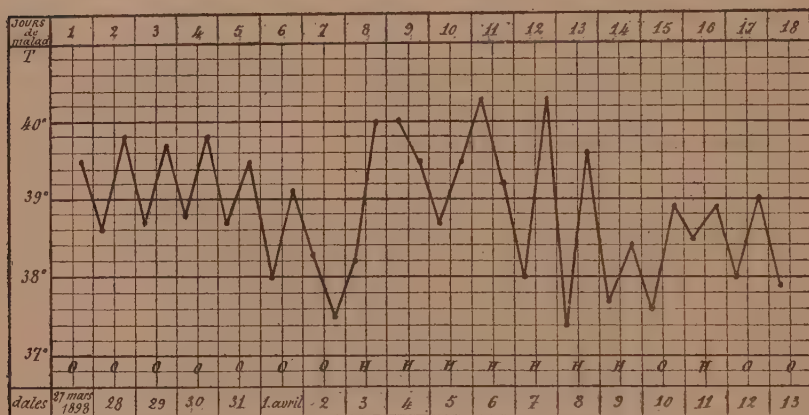


Fig. 3. B. A. 7. Première inoculation.

qui le tolèrent mais ne le détruisent pas. Il y a plus. Si l'on réfléchit, d'une part, à la fréquence du *Pirosoma* latent, d'autre part, à ce fait que le virus malarique inoculé amène presque toujours ¹ l'apparition de l'hématozoaire, il est difficile d'admettre que les bovidés ne sont pas réinfectables.

Voici un exemple, — auquel nous avons fait allusion dans un précédent travail, — de persistance de l'hématozoaire à l'état latent. Un animal de Crimée, âgé de un an et demi, est inoculé le 27 mars 1898, dans les veines, avec 1/10 de c. m. c. de sang malarique. Il présente de la fièvre et des hématozoaires. (Voir la courbe de la fig. 3.)

On le réinocule le 30 juin 1898, sous la peau, avec un demi c. c. de virus pesteux pur. Il contracte la peste bovine, mais offre, en même temps, des hématozoaires pendant la vie et après la mort (sang, foie, rate). Dans l'intervalle des deux infections, la santé s'était maintenue parfaite. (Voir la courbe suivante.)

L'accoutumance des races indigènes au virus malarique est

1. Toujours, pensons-nous, pour ce qui est des animaux adultes.

illimitée. On peut injecter des litres et des litres de sang virulent sans déterminer d'accidents. Cependant, le sérum des animaux ainsi traités, recueilli de 2 à 6 semaines après les inoculations massives, ne manifeste *aucun pouvoir préventif ni curatif*.

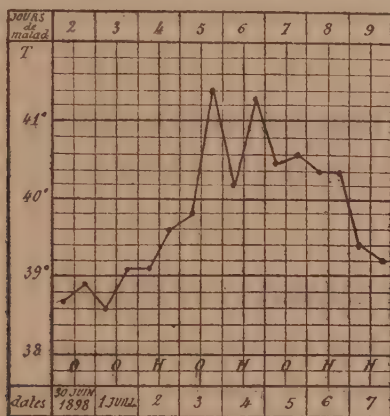


Fig. 4. B. A. 7. Deuxième inoculation.

Ce résultat nous semble peu encourageant pour la sérothérapie des affections à hématozoaires.

Les sels de quinine ont-ils une action thérapeutique sur la malaria des bovidés ? Lors de l'épidémie de Kutchuk-Tchiftlik nous n'avons pu traiter que deux animaux. L'injection de dix grammes de bichlorhydrate de quinine, par jour, s'est montrée absolument inefficace : les deux vaches ont succombé. Toutefois, l'alcaloïde avait certainement agi sur les hématozoaires ; car, dans un cas, ils ont disparu totalement du sang et presque totalement des viscères ; dans l'autre, ils ont diminué considérablement ; et dans les deux, la majorité des parasites existants était profondément altérée. Nous sommes convaincus que les sels de quinine pourraient être avantageusement employés comme moyen préventif.

Mentionnons, pour terminer, la toxicité du sang malarique. Tandis que le cobaye supporte sans dommage plus de 5 c. c. de sang normal de bœuf injectés dans le péritoine, il meurt rapidement après inoculation d'un c. c. de virus hématozoïque.

RAPPORT SUR LA STÉRILISATION INDUSTRIELLE DES EAUX POTABLES PAR L'OZONE

(Procédés et appareils de MM. Marmier et Abraham.)

PAR LE D^r A. CALMETTE.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

On sait aujourd'hui que l'eau d'alimentation est très souvent le véhicule des germes de maladies infectieuses, et depuis que cette constatation a été faite, les hygiénistes et les ingénieurs s'efforcent de rechercher, en s'appuyant sur les méthodes précises des sciences expérimentales, des procédés permettant d'éliminer aussi complètement que possible les microbes pathogènes que renferment trop souvent les eaux captées par les villes.

De nombreux moyens ont déjà été proposés pour arriver à ce but. Ils peuvent se diviser en deux grandes catégories :

1^o Les uns tendent à modifier les modes de captation des sources, des cours d'eau ou des nappes souterraines, de manière à éviter, autant que possible, toute cause de pollution par des germes microbiens venus de la surface du sol ;

2^o Les autres ont pour objet la séparation ou la destruction des germes dont on n'a pas pu éviter la présence dans les eaux qu'il s'agit de livrer à la consommation.

Beaucoup de villes très importantes sont obligées de s'alimenter soit à des cours d'eau impossibles à préserver de multiples causes de contamination, soit à des sources captées superficiellement dans des terrains cultivés et perméables aux infiltrations de la surface.

La ville de Lille se trouve dans ce dernier cas. Elle possède, dans une vaste plaine qui s'étend le long de la vallée de la Deule, surtout aux environs du village d'Emmerin, une série de

sources qui jaillissent au milieu de marécages et de terres cultivées. La nappe aquifère qui alimente ces sources a son origine dans la craie. Sa profondeur moyenne, la disposition de ses points d'émergence et le mode de captation adopté sont tels que, pendant toute l'année, les eaux sont peuplées de nombreux germes microbiens provenant des couches superficielles du sol arable.

Ces germes abondent principalement à l'époque des grandes pluies d'automne. La détermination des espèces auxquelles ils appartiennent ne laisse aucun doute sur les dangers incessants que peut provoquer leur ingestion. On constate d'ailleurs, chaque année, d'assez nombreux cas de fièvre typhoïde dans la population lilloise; il ne paraît pas douteux que la très grande mortalité infantile qui est relevée par l'Office sanitaire sous les rubriques « affections gastro-intestinales et athrepsie » doive être attribuée, au moins pour une large part, à la qualité défectueuse des eaux.

Justement préoccupée de cet état de choses, et désireuse de protéger le plus efficacement possible ses administrés contre les atteintes des maladies épidémiques, l'Administration municipale de Lille s'efforce, d'une part, d'augmenter dans une large mesure le débit actuel des sources d'Emmerin, devenu très insuffisant par suite de l'augmentation toujours croissante de la population; d'autre part, d'assurer l'innocuité parfaite des eaux qu'elle est obligée de distribuer.

Presque toutes les méthodes d'épuration que l'on a proposées jusqu'ici présentent des inconvénients sérieux, surtout lorsqu'il s'agit de les employer sur une large échelle.

Les filtres de terre poreuse, excellents pour filtrer l'eau à domicile, s'ils sont bien surveillés, ont un débit trop faible et coûtent trop cher pour qu'on puisse les utiliser à épurer l'eau d'alimentation d'une ville entière. La filtration sur couches de sable améliore les eaux, mais ne donne jamais une sécurité suffisante.

La stérilisation par la chaleur est trop coûteuse pour qu'on puisse songer à l'appliquer en grand; et, parmi les procédés d'épuration chimique, en l'état actuel de nos connaissances, le seul qui se soit montré pratiquement efficace et recommandable repose sur l'emploi de l'*ozone*.

On connaît, depuis longtemps, les propriétés énergiquement microbicides et oxydantes de l'ozone. L'application de ce gaz à la stérilisation des eaux potables a été proposée par plusieurs savants, en particulier par MM. Ohlmüller, Siemens et Halske, de Berlin, en 1891 ; plus récemment, en 1893, par MM. Tindal, Schreller et Van der Sleen, en Hollande.

Lors de l'Exposition d'hygiène de Paris organisée au Champ-de-Mars, en 1895, M. Tindal a montré la première réalisation pratique d'un appareil industriel permettant de traiter efficacement environ 2 mètres cubes d'eau à l'heure.

Cependant l'application du système n'a été effectuée dans aucune ville d'une façon régulière, et le problème de l'emploi pratique de l'ozone pour la stérilisation en masse des eaux potables restait toujours posé.

MM. Marmier et Abraham ont repris, dès 1895, l'étude de cette question, et nous pensons qu'ils lui ont fait faire un pas décisif.

Ces deux savants ont demandé, en février 1898, à l'administration municipale de Lille, l'autorisation d'installer, à l'usine élévatoire des sources d'Emmerin, un appareil industriel producteur d'ozone, en vue d'effectuer une grande expérience qui pût permettre de porter un jugement sur la valeur pratique du procédé et sur les appareils de leur invention.

Vivement intéressée par cette expérience, l'Administration municipale de la ville de Lille nous a priés de nous réunir en commission, d'en contrôler les résultats, et de lui donner notre avis sur la valeur du procédé.

Notre Commission, composée de MM. :

D^r Staes-Brame, adjoint au maire de Lille, président ;

D^r Roux, membre de l'Institut, sous-directeur de l'Institut Pasteur de Paris ;

Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des sciences de Lille ;

D^r Calmette, directeur de l'Institut Pasteur de Lille, professeur à la Faculté de médecine de Lille, rapporteur ;

Bourriez, expert chimiste ;

s'est réunie pour la première fois le 10 décembre 1898, à l'Institut Pasteur de Lille, pour l'élaboration du programme de ses travaux.

Ce programme étant arrêté, la Commission s'est divisée en deux sections : l'une, composée de MM. les Drs Roux et Calmette, s'est chargée du contrôle bactériologique ; l'autre, composée de MM. Buisine et Bouriez, s'est chargée de l'étude chimique des eaux d'Emmerin avant et après le traitement par l'ozone.

Conformément aux délibérations de la Commission, des prélèvements échelonnés d'échantillons d'eau non traitée et d'eau ozonée ont été effectués à Emmerin les 10, 11, 12 décembre 1898 et les 17, 24, 27 et 28 janvier 1899, afin qu'on pût se rendre compte de la valeur du procédé, en marche industrielle, continue et normale.

DESCRIPTION DES APPAREILS

L'essai de stérilisation des eaux est fait dans une petite usine contiguë à l'usine élévatoire des eaux de la ville de Lille.

L'installation comprend trois parties :

L'une A servant à la production du courant électrique ; la seconde B à la production de l'ozone ; la troisième C à la stérilisation de l'eau.

A — *Production du courant électrique.* — Cette partie électrique de l'usine contient un moteur à vapeur qui n'offre rien de bien particulier, et un alternateur. Le courant produit passe dans un transformateur à haut potentiel qui peut donner 40,000 volts et plus.

B — *Production de l'ozone.* — La production de l'ozone est assurée d'une façon régulière par deux appareils distincts : un ozonateur et un déflagrateur à tiges. Entre les tiges de ce déflagrateur jaillit une série d'étincelles efficaces dont une des fonctions consiste à assurer entre les pôles de l'ozonateur un potentiel régulier.

L'ozonateur est constitué de la façon suivante : une électrode, une glace, un intervalle, une glace, une électrode, une glace, un intervalle, une glace, un électrode, etc...

Les électrodes sont métalliques ; chacune présente deux surfaces planes opposées.

Ces surfaces sont parfaitement dressées ; sur chacune d'elles s'applique exactement une glace.

Toutes les électrodes de rang pair sont reliées à un pôle du

transformateur, celles de rang impair à l'autre pôle. Des précautions particulières ont été prises pour assurer l'isolement parfait de ces deux séries d'électrodes, pour des potentiels bien supérieurs à ceux habituellement employés.

C'est dans les intervalles des glaces que jaillit l'effluve, d'une belle couleur violette ; sous son action, l'oxygène de l'air se transforme en ozone. Grâce à un dispositif spécial, on n'extrait de l'appareil que de l'air ayant traversé l'effluve sur une longueur fixée d'avance ; toutes les particules d'air ont donc été soumises à une action uniforme de l'effluve.

La réfrigération des électrodes se fait *d'une façon continue, sans aucune interruption à la fois dans les deux séries d'électrodes. L'isolement parfait est néanmoins assuré* et il n'y a jamais de court circuit dans l'appareil. Ceci est obtenu en coupant convenablement la colonne d'eau réfrigérante au moyen de deux séries d'appareils à gouttes.

C — *Stérilisation de l'eau.* — Au sortir de l'ozoneur, l'ozone est envoyé dans une grande colonne en maçonnerie. C'est dans cette colonne qu'il rencontre l'eau à stériliser.

La stérilisation est obtenue grâce à une circulation méthodique de l'ozone et de l'eau. L'eau s'échappe au bas de cette colonne et se rend dans les réservoirs de l'usine élévatoire de la ville de Lille. Un déversoir calibré est établi sur le parcours de cette eau afin de pouvoir mesurer son débit.

CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES DU 10 AU 25 DÉCEMBRE 1898.

Les appareils ozoneurs étaient en marche continue pendant le jour seulement, depuis le commencement du mois de juillet.

Ils ont fonctionné jour et nuit pendant les 10, 11, 12 décembre.

Le débit normal de la colonne était de 35 mètres cubes d'eau stérilisée à l'heure.

Les échantillons d'eau ozonée, destinés à l'analyse bactériologique, ont été prélevés à Emmerin dans des ballons-pipettes stériles, en même temps que des échantillons d'eau non traitée.

Le 10 décembre, l'eau non traitée a étéensemencée dans 5 ballons, à la dose de 0 c. c. 01, pour un essai préliminaire. Après 24 à 60 heures, tous les ballons étaient altérés.

Ensemencée en gélatine nutritive dans des vases plats d'Erlenmeyer, à la dose de 0 c. c. 01 et 0 c. c. 05, la même eau non traitée a fourni à la numération, après 7 jours, 2,200 germes par cent. cube, dont 180 appartenant à des espèces liquéfiantes.

L'eau ozonée après passage à la colonne stérilisante, qui contenait de l'air ozoné à une concentration de 5 milligr. 8 d'ozone par litre d'air, a fourni les résultats suivants :

Étude de l'eau prélevée le 11 déc., à 10 heures du matin ¹.

Débit de la colonne : 35 mètres cubes d'eau à l'heure

Concentration : 5, 8 mgr. d'ozone par litre d'air.

Température à l'intérieur de l'ozoneur : 20°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU cent. cubes	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
Bouillon de viande neutre..	10	0,5	0	<i>B. subtilis.</i> <i>B. subtilis.</i>
— — — ..	5	1	1	
— — — ..	1	11	1	
— — — ..	2	12	0	
— — — ..	5	13	0	
Gélatine nutritive.....	5	1	0	
— — — ..		2	0	
<i>Résumé : 2 germes de B. subtilis pour une quantité totale de 74 cc. d'eau ozonée.</i>				

Le 11 décembre, à 5 heures du soir, on prélève à Emmerin de nouveaux échantillons d'eau brute et d'eau ozonée.

L'appareil ozoneur donnait alors une concentration de 6 milligr. 5; le débit de la colonne restait à 35 mètres cubes d'eau.

L'eau brute a été conservée 24 heures au laboratoire, à la

1. Dans ce tableau et ceux qui suivent, on trouve dans la première colonne l'indication du milieu d'ensemencement; dans la seconde, celle du nombre des ballons ou matras ensemencés; dans la troisième, celle de la quantité d'eau introduite dans chaque ballon ou matras; dans la quatrième, le nombre de germes après 45 jours à 36° pour les ballons, et après 7 jours à 23° pour les gélatines. La cinquième colonne indique les espèces microbiennes observées.

température moyenne de 18°. Ensemencée le 12 après midi, elle a fourni en gélatine, après 7 jours, 3,960 germes dont 340 liquéfiant, par cent. cube.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 11 DÉCEMBRE A CINQ HEURES DU SOIR.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	10	1	0	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	5	0,5	0	
— — — ..	5	1,3	1	
— — — ..	3	4	0	
Gélatine nutritive.....	3	1,5	2	1 moisissure. 1 <i>B. subtilis.</i>

Résumé : 2 germes de *B. subtilis* et 1 moisissure pour une quantité totale de 35 c. c. 5 d'eau ozonée.

Le 12 décembre on prélève à Emmerin :

1 ballon-pipette d'eau ozonée ;

1 second ballon-pipette de la même eau, que la Commission se propose d'analyser seulement après 4 jours pour y observer la pullulation des germes.

Les résultats de ces deux analyses sont consignés dans les tableaux ci-après.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 12 DÉCEMBRE À 10 HEURES DU MATIN.

Concentration = 6 milligr.,5 d'ozone par litre d'air.

Température à l'intérieur de l'ozonateur 18°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes		
Bouillon de viande neutre..	5	1,3	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	5	4	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	11	0	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	21	1	
Gélatine nutritive.....	4	1,5	0	
— — — ..	3	4	0	

Résumé : 3 germes de *B. subtilis* pour une quantité totale de 76 cc., 5 d'eau ozonée.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 12 DÉCEMBRE, À 10 HEURES DU MATIN, ET CONSERVÉE PENDANT 4 JOURS AU LABORATOIRE À 18° AVANT ENSEMENTEMENT.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU cent. cubes.	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
Bouillon de viande neutre..	5	1	0	
— — — — —	5	0,5	0	
Gélatine nutritive.....	4	1	0	
<i>Résumé : Aucun germe microbien dans 11 c.c. 5 d'eau ozonée, conservée avant ensemencement 4 jours au laboratoire, à la température moyenne de 18° centigr.</i>				

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Le 17 janvier 1899, une prise d'échantillon d'eau ozonée est effectuée (concentration de l'ozone, 6 milligr. par litre d'air).

Le ballon pipette est conservé au laboratoire pendant 24 heures avant les ensemencements.

Le 24 janvier, un nouvel échantillon prélevé est conservé 36 heures avant les ensemencements.

Voici les résultats de ces deux analyses :

1^o EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 17 JANVIER, ANALYSÉE APRÈS 24 HEURES

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU cent cubes.	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
Bouillon de viande neutre..	17	1,2	0	
2 ^o EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 24 JANVIER ET ANALYSÉE APRÈS 36 HEURES				
Bouillon de viande neutre..	2	7	0	
— — — — —	1	13	0	
— — — — —	1	15	0	
<i>Résumé : L'eau ozonée, conservée 24 et 36 heures au laboratoire après le prélèvement, reste stérile.</i>				

Les 27 et 28 janvier 1899, une dernière série d'expériences est effectuée par la Commission sur deux prélèvements à 24 heures d'intervalle.

L'appareil ozoneur était en marche continue, c'est-à-dire jour et nuit, depuis 60 heures. Le débit de la colonne était de 35 mètres cubes d'eau à l'heure; la concentration de 9 milligr. 3 d'ozone par litre d'air.

L'eau brute, prélevée le 27 matin, en même temps que les échantillons d'eau ozonée, fournit à la numération, après six jours, en gélatine, 1,170 germes par centimètre cube.

Un second échantillon de la même eau, prélevé le 28 matin, donne 988 colonies par centimètre cube.

Un ballon-pipette d'eau ozonée prélevé le 28 matin est réservé pour être soumis à l'analyse le 30 janvier, après 48 heures de séjour au laboratoire.

Les résultats des analyses effectuées avec l'eau ozonée les 27, 28 et 30 janvier sont consignés dans les trois tableaux ci-après :

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE A EMMERIN LE 27 JANVIER A 10 H. DU MATIN.

Concentration d'ozone : 9 milligr. 3 par litre d'air.

Débit : 35 m. cubes d'eau à l'heure.

Température extérieure : + 1°, et température à l'intérieur de l'ozoneur 13°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes		
Bouillon de viande neutre..	20	4,2	0	
— — — — —	4	3	0	
— — — — —	4	3,5	0	
— — — — —	5	4	0	
— — — — —	2	12	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — — —	1	16	1	<i>B. subtilis.</i>
Gélatine nutritive.....	7	3	0	
— — — — —	3	5	0	
Résumé : 146 c. c. d'eau ozonée, répartis dans 46 ballons ou matras, ont donné : 2 germes de <i>B. subtilis</i> .				

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE A EMMERIN LE 28 JANVIER A 10 H. DU MATIN.

Concentration d'ozone par litre d'air : 9 milligr. 5.

Débit de la colonne : 35 m. c. à l'heure.

Température à l'extérieur de l'ozoneur 8°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	41	1,3	0	
— — — ..	45	2,2	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	2	43	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	9	0	
— — — ..	2	10	0	
— — — ..	1	45	0	
— — — ..	2	18	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	25	1	<i>B. subtilis.</i>
Gélatine nutritive.....	6	2,2	0	

Résumé : 192 c. c. 6 d'eau ozonée répartis dans 41 ballons ou matras ont donné 4 germes de *B. subtilis*.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 28 JANVIER A 10 H. DU MATIN : ANALYSÉE
LE 30 JANVIER APRÈS 48 HEURES DE SÉJOUR AU LABORATOIRE A LA
TEMPÉRATURE DE + 18°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
Bouillon de viande neutre..	6	4	0	
— — — ..	6	2	0	
— — — ..	1	8	0	
— — — ..	3	10	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	11	0	
— — — ..	1	12	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	1	13	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	3	14	1	<i>B. subtilis.</i>
— — — ..	2	20	1	<i>B. subtilis.</i>

Résumé : 175 c. c. d'eau ozonée conservée 48 heures au laboratoire ont donné 5 germes de *B. subtilis* revivifiables par la culture en bouillon à 36°.

En présence de ces résultats excellents, la Commission a voulu se rendre compte de certains faits qui avaient attiré son attention au cours des expériences effectuées.

Il semblait extraordinaire, par exemple, que l'eau ozonée conservée 12, 24, 36 heures et même 4 jours au laboratoire, restât stérile, et se montrât relativement plus pauvre en germes

que l'eau analysée très peu de temps après la prise d'échantillons.

On pourrait supposer :

Ou bien que les quelques germes de *B. subtilis* qui échappaient à l'action de l'ozone pendant le passage à la colonne, étaient détruits ultérieurement par une très petite quantité d'ozone qui pourrait rester dans le liquide pendant les premières heures qui suivent le prélèvement;

Ou bien que l'ozonisation engendre dans l'eau des substances chimiques qui empêchent la pullulation des germes.

Pour répondre à ces questions, nous avons mélangé à 373 c. c. d'eau ozonée prélevée le 23 janvier et conservée 3 jours au laboratoire, 68 c. c. d'eau brute prélevée le 26 du même mois.

Le mélange a été ensemencé le 28, soit après deux jours de contact, à la dose de 0 c. c. 1 dans 6 matras de gélatine nutritive.

La numération des colonies effectuée après six jours de culture à 23° a donné 1,340 germes par centimètre cube. *Donc l'eau ozonée ne renferme aucune substance antiseptique capable de stériliser les germes de l'eau non ozonée avec laquelle on la mélange et d'empêcher leur pullulation.* Comme nous avons constamment remarqué que l'eau ozonée est d'autant plus pauvre en germes que les ensemencements sont faits plus longtemps après le prélèvement des échantillons, nous sommes obligés de conclure que, si le plus grand nombre des germes contenus dans l'eau est détruit pendant le passage à la colonne, la presque totalité de ceux qui échappent à cette phase de l'opération succombent après quelques minutes dans les réservoirs où s'accumule l'eau sortant des appareils.

Ce fait est très intéressant à signaler et il présente une importance pratique considérable, parce qu'il montre que l'eau ozonée, bien qu'elle ne renferme déjà plus de traces d'ozone quelques minutes après sa sortie des appareils, ne permet plus dans son sein la pullulation des germes de *B. subtilis* qui ont pu échapper à la stérilisation.

Analyse chimique. — M. Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des sciences de Lille, et M. Bouriez, expert-chimiste, étaient chargés d'effectuer l'analyse comparative des eaux d'Emmerin avant et après le traitement par l'ozone, surtout au point de vue de la teneur en oxygène, en matières organiques et en nitrates.

Il était nécessaire, en effet, de savoir si le traitement par l'ozone n'avait pas pour résultat d'augmenter dans de trop grandes proportions la teneur des eaux en nitrates, par suite de l'oxydation des matières organiques contenues dans ces eaux.

Il fallait aussi connaître les effets de l'ozone sur la teneur en matières organiques.

Voici les résultats fournis par les chimistes-experts de la Commission :

ANALYSE CHIMIQUE DES ÉCHANTILLONS D'EAU PRÉLEVÉS
LE 12 DÉCEMBRE 1898

	EAU NON TRAITÉE PAR litre.	EAU OZONÉE PAR litre.
Matières organiques (évaluées en acide oxalique).....	0 ^{gr} ,014	0 ^{gr} ,003
— — — (en oxygène, procédé A. Lévy).....	0 ^{gr} ,00088	0 ^{gr} ,00080
Azote nitrique (en nitrate de potasse, procédé Schlœsing).....	0 ^{gr} ,034	0 ^{gr} ,030
Azote nitrique (procédé Grandval et Lejoux).....	0 ^{gr} ,020	0 ^{gr} ,019
Azote nitreux (par la métaphénylène-diamine).....	0	0
— (par la résorcine).....	0 ^{gr} ,0005	0 ^{gr} ,003
Ammoniaque (par le réactif de Nessler).....	0	0
Oxygène dissous.....	9 ^{mgr} ,7	9 ^{mgr} ,8

CONCLUSIONS

En résumé, l'ensemble des analyses bactériologiques et chimiques que nous avons faites pendant la période qui s'étend du 10 décembre 1898 au 12 février 1899 nous conduit à conclure que :

1^o Le procédé de stérilisation des eaux d'alimentation par l'ozone, basé sur l'emploi des appareils ozoneurs et sur la colonne de stérilisation de MM. Marmier et Abraham, est d'une efficacité incontestable, et cette efficacité est supérieure à celle de tous les procédés de stérilisation actuellement connus, susceptibles d'être appliqués à de grandes quantités d'eau ;

2^o La disposition très simple de ces appareils, leur robustesse, la constance de leur débit et la régularité de leur fonctionnement donnent toutes les garanties que l'on est en droit d'exiger d'appareils vraiment industriels ;

3° Tous les microbes pathogènes ou saprophytes que l'on rencontre dans les eaux étudiées par nous sont parfaitement détruits par le passage de ces eaux dans la colonne ozonatrice. Seuls, quelques germes de *Bacillus subtilis* résistent. On compte environ un germe appartenant à cette espèce par 15 c. c. d'eau traitée avec une concentration d'ozone égale à 6 milligrammes par litre d'air.

Avec une concentration de 9 milligrammes, le nombre des germes de *B. subtilis* revivifiables par la culture en bouillon s'abaisse à moins de 1 pour 25 c. c. d'eau traitée. Il importe d'observer que le *B. subtilis* (microbe du foin) est tout à fait inoffensif pour l'homme et les animaux, et d'ailleurs les germes de ce microbe résistent à la plupart des moyens de destruction tels que le chauffage à la vapeur sous pression à 110°. Il n'est donc pas utile d'exiger sa disparition complète des eaux destinées à la consommation, et nous considérons comme très suffisante la stérilisation obtenue par l'air ozonisé avec une concentration de 5 à 6 milligrammes par litre, dans les conditions où se placent MM. Marmier et Abraham;

4° L'ozonisation de l'eau n'apporte dans celle-ci aucun élément étranger, préjudiciable à la santé des personnes appelées à en faire usage. Au contraire, par suite de la non augmentation de la teneur en nitrates et de la diminution considérable de la teneur en matières organiques, les eaux soumises au traitement par l'ozone sont moins sujettes aux pollutions ultérieures et sont, par suite, beaucoup moins altérables. Enfin, l'ozone n'étant autre chose qu'un état moléculaire particulier de l'oxygène, l'emploi de ce corps présente l'avantage d'aérer énergiquement l'eau et de la rendre plus saine et plus agréable pour la consommation, sans lui enlever aucun de ses éléments minéraux utiles;

5° En ce qui concerne la ville de Lille, notre avis est qu'il y a lieu de recommander à l'Administration municipale l'adoption du procédé de MM. Marmier et Abraham, lequel, ainsi que nous en avons acquis la certitude, assurerait l'innocuité absolue et permanente des eaux d'Emmerin qui alimentent l'agglomération lilloise.

Nous pensons aussi qu'étant donnée la sécurité de ce mode d'épuration, la ville de Lille trouverait un avantage immédiat à

augmenter le débit des sources actuelles par le simple apport d'eaux de rivière ou de canaux du voisinage, grossièrement filtrées par une digue de sable et stérilisées ensuite en même temps que l'eau des sources, au moyen des appareils ozoneurs.

Quelle que soit la profondeur à laquelle seront creusées les galeries souterraines de captation actuellement projetées aux environs de Lille, on ne peut affirmer que l'homogénéité du sol sera assez parfaite pour mettre sûrement l'eau collectée à l'abri des infiltrations de la surface. Les galeries percées dans la craie qui alimentent la ville de Reims nous en fournissent un exemple. La teneur en germes et en matières organiques de l'eau qui s'y trouve captée varie dans des proportions considérables (de 2,000 à 5,000 germes par c. c. et de 12 à 40 milligrammes de matières organiques par litre), et la fièvre typhoïde produit de fréquents ravages dans la population de cette ville.

La captation des eaux profondes au moyen des galeries ne donne donc pas aux hygiénistes une sécurité beaucoup plus grande que la captation des eaux superficielles.

Nous pensons, en conséquence, que, pour éviter la propagation des maladies infectieuses par l'eau d'alimentation, celle-ci doit, si elle est exposée à des pollutions, être stérilisée par un procédé efficace, tel que celui dont nous avons pu contrôler les résultats dans le présent rapport.

Signé :

Les membres de la Commission :

D^r ROUX ; BOURIEZ ;
D^r CALMETTE, rapporteur ; BUISINE ;
D^r STAES BRAME.

Lille, le 12 février 1899.

UNE SARCINE PATHOGÈNE

PAR LE D^r LOEWENBERG.

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff.)

La fétidité de l'air expiré par les fosses nasales est provoquée, la plupart du temps, par l'ozène vrai, affection caractérisée, en dehors de ses signes cliniques, par la présence d'un microbe dont nous avons signalé, dès 1884 ¹, l'existence, et étudié la biologie dans ces *Annales* ².

Depuis, nous avons vu que dans certains cas, très rares il est vrai, la fétidité de l'haleine émise par les fosses nasales peut être provoquée par l'envahissement de la muqueuse pituitaire par d'autres microbes que celui particulier à l'ozène.

Voici un cas de ce genre, dû à la présence d'une sarcine non encore décrite qui, à la différence des autres sarcines, est pathogène pour les animaux. La particularité de ce cas est encore rehaussée par sa rareté. Nous n'en n'avons rencontré qu'un seul dans le nombre considérable — il dépasse certainement mille — de personnes examinées par nous pour cause de fétidité de l'air expiré par le nez.

Étude bactériologique du microbe. — La sarcine en question a été rencontrée dans les deux fosses nasales d'une malade affectée de punaisie depuis de longues années, et chez laquelle les caractères cliniques de la maladie différaient radicalement de ceux qui caractérisent l'ozène vrai.

Le mucus nasal de la patiente se montrait composé exclusivement de leucocytes polynucléaires et d'une énorme proportion de paquets d'une même sarcine. Celle-ci présentait l'aspect caractéristique de ce genre de microbes, et a toujours montré le même aspect, sans mélange d'aucun autre microbe.

Les cultures en tubes et sur plaques de Petri donnaient inva-

1. 3^e Congrès otologique international, Bâle, 1884 (travail reproduit dans l'*Union médicale*, 1884).

2. Voir ces *Annales*, mai 1894.

riablement de nombreuses colonies sarciniques, mais, en outre, étaient pures. Au fur et à mesure que le traitement a amené d'abord une amélioration, puis finalement la guérison complète et définitive, la proportion des paquets sarciniques dans les préparations du mucus et le nombre des colonies du microbe dans les cultures ont diminué, pour aboutir, enfin, à la disparition complète du micro-organisme et des symptômes pathologiques.

Cette sarcine est immobile : elle prend les couleurs basiques d'aniline, moins bien les couleurs acides.

Elle se colore bien par le procédé de Gram. Quelquefois, on la voit cerclée d'une espèce d'auréole. Ces auréoles se fondent parfois en une masse unique lorsque les sarcines sont rapprochées.

Dans le mucus nasal de la malade, les divers individus de la sarcine se montrent quelquefois réunis par des filaments fins, dont il est difficile de déterminer la nature, attendu que, dans certains cas, ils prennent la substance colorante qui ne les teinte pas dans d'autres. Ces fils atteignent jusqu'à 20 et même 30 fois la longueur du microbe et sont souvent ramifiés¹. Ils sont généralement rectilignes, quelquefois cependant moniliformes.

La sarcine pousse à la température ordinaire, mais beaucoup mieux encore à celle de l'étuve. Sur les milieux solides usuels, elle forme des enduits luisants et comme moites, d'un blanc laiteux opaque, quelquefois légèrement jaunâtre. Ils sont copieux, bombés au milieu et s'étendent assez rapidement. Les colonies isolées ressemblent à des gouttelettes de lait bien crémeux.

Sur gélose, la sarcine donne de très belles cultures. Les colonies s'épaississent rapidement et présentent bien l'aspect qui vient d'être décrit, aspect qu'elles gardent très longtemps même lorsque, en grandissant, elles se fondent les unes aux autres.

Même aspect sur gélatine, qui ne se liquéfie pas même après de longs mois.

Sur les plaques de gélatine, les colonies isolées se présentent comme il vient d'être exposé, et passent, en vieillissant, légèrement au jaune. Elles se montrent noires à la lumière transmise, blanches à la lumière incidente.

1. D'après une communication orale, M. L. Martin a observé des prolongements analogues chez une sarcine retirée de la cavité buccale.

Piquée dans la gélatine, la sarcine forme, jusqu'au bout de la piqûre, un chapelet composé de grains souvent assez volumineux. En haut, apparaît une plaque blanche, à contours irréguliers lobulés ou festonnés, formés sans doute par la fusion d'un certain nombre de colonies à délimitation circulaire.

En piqûre dans la gélose, le microbe montre les grains du « chapelet » plus fins que dans la gélatine. A la face supérieure, il se forme un disque étendu, d'aspect gras et de contours irréguliers.

Sur plaques de gélose, développement comme sur gélatine ; sur les deux, les colonies présentent des contours circulaires ou ovoïdes, et toujours unis. A un faible grossissement, elles paraissent finement grenues.

Ensemencée sur la gélatine additionnée d'acide tartrique, la sarcine ne pousse pas. Il en est de même sur la pomme de terre cuite et humectée avec une solution du même acide à 3 0/0. Par contre, elle pousse copieusement sur la pomme de terre préparée à la façon ordinaire, où elle forme des colonies isolées ou des traînées d'un beau blanc, d'aspect humide, comme sur les autres milieux usuels.

La sarcine se cultive très bien dans les *milieux liquides ordinaires* où elle forme, dès le lendemain de l'ensemencement, un dépôt qui augmente de volume peu à peu, tandis que, au-dessus, le liquide reste clair.

Quand on agite le tube, le dépôt s'élève, pareil à un nuage blanc très cohérent. Le liquide demeure alcalin.

La sarcine se développe aussi dans le bouillon peptonisé, le bouillon d'ascite et la décoction de foin, mais je n'ai pas réussi à la faire pousser dans une décoction de navets.

Elle pousse bien dans le lait stérilisé, qui reste alcalin et ne se coagule pas.

Si la sarcine se présente dans le mucus nasal de notre malade sous la forme caractéristique de paquets cubiques, elle ne tarde pas à perdre ce mode de groupement significatif dans les cultures successives sur milieux solides. Elle ne se multiplie bientôt plus, dès lors, que dans deux sens perpendiculaires l'un à l'autre, de façon à former seulement des plaques à une seule épaisseur, composées de 4, 8 individus.

En outre, en continuant à l'ensemencer sur milieux solides,

on constate qu'elle se dissocie de plus en plus. Finalement ce ne sont plus que des cocci, groupés tantôt en amas, tantôt en chaînettes.

On sait, d'ailleurs, que les congénères de notre microbe, par exemple les *sarcinae aurea et lutea*, se comportent de même. Conservées dans les laboratoires et après une longue série d'ensemencements sur des milieux solides, leurs cultures ne sont plus composées que de cocci désagrégés.

Par contre, lorsqu'on sème une prise d'une de ces cultures (de notre sarcine) dans un milieu liquide, elle reprend le groupement caractéristique.

Si la sarcine croît vigoureusement sur tous les milieux usuels, elle est, en outre, très résistante. Ainsi, en empruntant la semence à de vieilles cultures desséchées depuis des mois (sur pomme de terre par exemple), nous avons réussi à la faire pulluler de nouveau.

Notre sarcine pousse bien en culture anaérobie, sans y dégager ni gaz ni odeur.

Détermination de l'espèce microbienne. — Notre sarcine ne saurait être confondue avec un autre microbe, avec lequel elle n'est pas sans présenter quelques ressemblances. Nous voulons parler du *micrococcus tetragenis*. Mais ce microbe ne prend pas la forme sarcine.

Les caractères signalés ci-dessus semblent en outre la distinguer des autres espèces de sarcines déjà connues. Dans une étude récente sur ce groupe, M. Stubenrath ¹ rejette le plus grand nombre des espèces de sarcines à colonies blanches établies avant lui, et les réunit toutes sous les trois dénominations suivantes : *alba*, *variabilis* et *canescens*. Or, aucune de ces trois ne correspond à la nôtre, attendu qu'elles liquéfient la gélatine et donnent, en culture anaérobie, un dégagement abondant de H²S, propriétés qui font défaut à notre microbe.

Propriétés pathogènes de la sarcine. — La nouvelle sarcine se distingue en outre de toutes les autres en ce qu'elle est pathogène pour les animaux. Jusqu'ici on n'a encore reconnu des propriétés pathogènes à aucune sarcine, témoins les multiples

1. F. C. STUBENRATH, Das Genus sarcina, Munich, 1897.

expériences de Salkowski et Leube¹, Welcker², de Bary³, Hauser⁴, Hasse⁵, etc., qui ont injecté aux animaux de fortes doses de sarcines par les différentes voies, même dans la jugulaire, sans obtenir aucun effet pathologique. Stubenrath a également échoué et conclut ainsi : « Aucune sarcine n'a été reconnue comme pathogène pour l'homme ni pour les animaux⁶ ».

Notre sarcine, au contraire, est pathogène pour les animaux de laboratoire, ainsi que cela ressort de nos expériences, que nous allons exposer brièvement.

Les inoculations furent pratiquées de la façon suivante : une culture de 24 heures sur gélose fut raclée et diluée avec 5 c. c. d'eau ou de bouillon stérilisés. De ce mélange, les lapins et les cobayes reçurent chacun 2 c. c. dans la cavité péritonéale, tandis que le c. c. restant fut injecté sous la peau d'une souris blanche.

Les animaux ainsi inoculés mouraient dans les 24 heures. En employant des cultures plus vieilles, la survie pouvait être plus longue.

A l'autopsie, on constatait chez les cobayes une péritonite des plus intenses. La cavité abdominale contenait en quantité considérable un liquide jaune grisâtre, louche et très visqueux. L'intestin grêle se trouvait parfois rougeâtre et fortement diarrhéique. Au microscope, l'exsudat contenu dans la cavité abdominale se montrait composé d'une « purée » de sarcines entremêlées de quelques leucocytes. Sa culture donnait, en raison de l'extrême abondance des colonies, une bande confluyente composée de sarcines, surtout de belles tétrades. Dans certaines cultures, celles-ci étaient, presque toutes, réunies entre elles par des filaments analogues à ceux décrits plus haut et qui prenaient bien la fuchine.

La rate était petite. Le foie se trouvait congestionné. Ces deux organes présentaient beaucoup de sarcines à leurs surfaces mais n'en montraient aucune dans leurs tissus.

1. SALKOWSKI et LEUBE, Die Lehre vom Harn, Berlin, 1882, p. 452.

2. H. WELCKER, Ueber Sarcina etc. *Zeitsch. f. ration. Medicin.*, 1859, p. 199 et suiv.

3. GUSTAVE HAUSER, Ueber Lungensarcine. *Deutsch. Archiv. fur Klin. Med.*, 1888, p. 427 et suiv.

4. DE BARY, Vorlesungen ueber Bakterien, 1883, p. 93.

5. H. E. HASSE, Beobachtungen ueber die Sarcina ventriculi 1847, cit. d'après Stubenrath.

6. *Loc. cit.* p. 84 et 87.

Les capsules surrénales étaient plus foncées et infiltrées d'un exsudat hémorragique.

La plèvre contenait un exsudat louche, quelquefois sanguinolent, renfermant quelques sarcines. Pas de microbes dans le poumon; celui-ci surnageait et ne présentait aucune altération.

Le sang du cœur était coagulé. Au microscope, il ne montrait pas ou très peu de sarcines, mais ses cultures donnaient toujours des colonies pures, quelquefois abondantes, au point de former une couche confluyente d'un beau blanc laiteux.

Quant aux lapins inoculés, il y en eut qui survécurent à des doses sûrement mortelles pour les cobayes. Les autres succombaient à des infections assez rapides, quelquefois même dans les 24 heures.

Voici les lésions que l'autopsie révélait chez eux : Péritonite généralisée; péritoine très congestionné. Liquide ascitique presque clair, filant et gélatineux. Chez quelques lapins, on voyait des masses presque concrètes, ressemblant à du pus épaissi, qui recouvraient les bosselures et surtout les étranglements du gros intestin.

Foie très hyperémie, rate petite, capsules surrénales normales. Plèvre contenant un liquide clair qui donnait une culture pure de sarcines.

Sang du cœur : même résultat que chez les cobayes.

L'exsudat péritonéal, de même que les masses concrètes recouvrant le colon, se composaient d'innombrables sarcines, de quelques leucocytes polynucléaires et de peu d'hématies.

Les cultures donnaient une bande confluyente et étaient pures.

Les souris blanches, injectées sous la peau du dos, mouraient dans les 24 heures. L'autopsie ne montrait, en général, aucune lésion appréciable à l'œil nu. Chez une souris cependant, il y eut une péritonite généralisée et du liquide dans les sacs pleuraux. Le sang de tous ces animaux renfermait quelques sarcines et donnait sur gélose, dans les 24 heures, une culture pure en bande continue.

Le microbe devint petit à petit moins actif pour les lapins et les souris, tout en continuant à tuer les cobayes dans les 24 heures. Les lapins et les souris mouraient dans des délais de plus en plus longs, et, finalement, résistaient tout à fait.

Plus tard, les cobayes survivaient parfois à l'inoculation dans la cavité abdominale de doses massives d'une culture fraîche.

Quand nous nous sommes aperçu de ce fait, la malade qui nous avait fourni le microbe, et sur laquelle nous comptions pour le retrouver avec sa virulence originelle, avait subi l'influence favorable du traitement indiqué et était absolument guérie. De nombreuses prises du mucus ne donnèrent plus aucune colonie de sarcines.

Des injections massives dans le péritoine des cobayes, animaux très sensibles, furent impuissantes à rendre au microbe sa virulence perdue. Il en fut de même pour des cultures en sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale de différents cobayes.

A quoi est dû le caractère pathogène de la sarcine que nous venons d'étudier? Ce n'est certainement pas à une association microbienne, car la sarcine était seule dans les fosses nasales. Peut-être est-ce à une déviation de la sécrétion de la pituitaire, qui s'est toujours trouvée alcaline chez notre malade, tandis qu'elle est habituellement neutre. N'ayant pas vu cette malade lorsqu'elle était en santé, il nous est impossible de dire si cette alcalinité du mucus est la cause ou le résultat de l'implantation du microbe qui rend alcalins ses milieux de culture. A ce propos, il est intéressant de rappeler que le mucus nasal est également alcalin dans tous les cas d'ozène vrai. Une seule fois, nous y avons trouvé la sécrétion nasale neutre; c'était chez une petite fille punaise où le microbe spécial était associé avec un autre bacille¹.

Enfin, quant à la relation entre la fétidité de l'haleine et la présence de la sarcine, elle n'est établie que par ce fait que, la sarcine disparue, la fétidité a disparu en même temps. Nous n'avons pas réussi à l'établir autrement; car nos tentatives d'implantation de la sarcine dans les fosses nasales, chez les lapins et les cobayes, ont échoué. D'autre part, les cultures de la sarcine ne nous ont présenté aucune odeur appréciable, contrairement à celles du cocco-bacille de l'ozène vrai, qui ont une odeur très prononcée¹.

1. V. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, mars 1894.

RECHERCHES SUR LA FIÈVRE RÉCURRENTE

PAR LE D^r J. BARDACH

Privat-docent de bactériologie à l'Université d'Odessa.

Une courte épidémie de fièvre récurrente a sévi à Odessa pendant le printemps de l'année 1897.

J'en ai profité pour faire des observations et quelques expériences ¹.

Dans la 2^e livraison de ces *Annales* de l'année 1896, M. Gabritchewsky a publié un mémoire dans lequel il indique une nouvelle propriété intéressante du sang de l'homme et du singe ayant subi la fièvre récurrente; ce sang détruit les spirilles d'Obermeyer qu'on y introduit. Ce phénomène a lieu d'autant plus vite et plus complètement que le sang a été puisé plus tôt après la crise.

Les spirilles subissent différentes modifications : ils gonflent, se déroulent, deviennent immobiles, granuleux, et finissent par se désagréger complètement.

M. Gabritchewsky regarde cette propriété comme étant en relation de causalité avec l'augmentation graduelle du pouvoir spirillicide qui se produit dans le plasma sanguin avant la crise : ce plasma reçoit à ce moment des corps correspondants aux « anticorps » de Pfeiffer.

J'ai profité de l'occasion pour vérifier ces observations.

I

Le sang, puisé chez le malade avec toutes les précautions nécessaires, était mis en gouttes suspendues et entourées par de la paraffine. Quelques-unes de ces préparations étaient gardées à la température de la chambre (16-20°), d'autres à l'étuve à 36°,5. Elles étaient examinées tous les quarts d'heure. Toutes mes observations ont été faites avec des gouttes suspendues et je ne vois aucun inconvénient à ce procédé.

1. Je remercie les D^{rs} Rosenstein et Villenz, qui ont bien voulu mettre leurs malades des hôpitaux à ma disposition.

Les spirilles se conservent pendant 3-4 jours en gouttes suspendues à la température de la chambre. D'après mes expériences, ils périssent notablement plus vite à la température de 36°,5. Ainsi, dans le sang humain, ils ne persistent que pendant 18-48 heures, et pendant 23 à 57 heures dans celui du singe.

Vu la fragilité des spirilles, il est probable que les plus faibles d'entre eux périssent déjà pendant leur extraction des vaisseaux. Le changement de milieu, produit par la coagulation du sang, doit leur être nuisible, et c'est peut-être justement cela qui abrège leur existence. La coagulation peut être accompagnée de la formation de nouveaux produits dans le sérum. Il est possible qu'une température élevée favorise l'action nocive de ces produits.

Il est évident qu'on ne peut juger de la durée des spirilles dans l'organisme par ce qui se passe *in vitro*.

Ainsi les spirilles de B. (voir le tableau I, expériences a, 24/III) ont vécu hors de l'organisme pendant 28 heures à la température de 36°,5. Par contre, dans l'organisme ils vécurent au moins 40 heures.

Dans l'expérience du 25/III, les spirilles vécurent 18 heures hors de l'organisme et 46 dans l'organisme. Dans l'expérience b les spirilles pris chez K le premier jour de l'accès, vécurent *in vitro* pendant 17 heures, et dans l'organisme humain pendant 108 heures.

La durée relativement courte de leur vie dans cette expérience peut être expliquée par le fait que ces spirilles étaient peu nombreux et qu'ils n'avaient pas eu le temps de s'adapter. Pris le lendemain chez le même malade, ils vécurent *in vitro* pendant 27 heures et 84 heures dans l'organisme; le 3^e jour, 48 *in vitro* et 60 dans l'organisme; le 4^e jour, 45 *in vitro* et 36 dans l'organisme.

Dans les expériences suivantes, les spirilles vécurent *in vitro* à la température de 36°,5 pendant 21, 27, 30 et 31 heures, et dans l'organisme 108, 5, 84 et 60 heures.

Comme on voit, il n'y a pas de corrélation entre la durée de la vie *in vitro* et *in vivo*.

Nous retrouvons le même manque de corrélation chez le singe, comme c'est démontré par le tableau III. Par exemple dans l'expérience 1^{re}, ces spirilles ont vécu *in vitro* à la tempéra-

ture de 36°,5 pendant 57 heures, et dans l'organisme pas plus de 18 heures. Ce fait est encore plus frappant dans l'expérience 2 : les spirilles disparaissent dans l'organisme après 6 heures, et après 40 heures à l'étuve.

Dans l'expérience 3, les spirilles disparaissent du sang en 2 heures et vivent *in vitro* pendant 28 heures.

L'inverse a lieu dans l'expérience 5 : les spirilles résistent dans l'organisme pendant 108 heures et seulement pendant 36 *in vitro*. Les expériences prouvent donc que la durée de la vie des spirilles *in vitro* et *in vivo* n'est en aucune corrélation régulière.

Je reviens aux expériences de l'action du sang apyrétique sur les spirilles. Dans la majorité de nos observations, nous avons constaté — d'accord avec Gabritchewsky — l'action spirillicide du sang apyrétique. Mais en même temps il faut observer que les limites de cette action varient beaucoup.

Ainsi les spirilles vivent de 1 à 36 heures à la température de 36°,5, et de 4 à 80 heures à la température de la chambre. Du reste, comme l'a indiqué Metchnikoff, on observe aussi de grandes variations du pouvoir bactéricide dans les expériences de Gabritchewsky. *Ivanoff* indique aussi ces variations dans son article.

D'après quelques expériences, on aurait pu se croire autorisé à conclure à une relation entre la crise et l'augmentation rapide du pouvoir spirillicide du sang. Ainsi par exemple, dans l'expérience F (tableau II), les spirilles meurent, le 7^{me} - 8^{me} jour de l'apyrexie, en 1 1/2 à 4 heures à la température 36°,5, et après 8 heures à la température ordinaire. Dans l'expérience H, les spirilles meurent le 8^{me} et 9^{me} jour de l'apyrexie après 1 heure, — 1 3/4 à la température 36°,5, et après 4-8 heures à la température ordinaire. Ici le pouvoir spirillicide marqué coïncide avec le fait qu'il n'y a eu que deux accès, tandis que dans l'épidémie que je décris, il y a eu généralement 3 et rarement 4 accès. Mais si nous nous adressons aux autres expériences, comme par exemple à l'expérience A, nous allons voir que le malade C (tableau II) ayant subi une forte fièvre récurrente avec trois accès (41° pendant la 2^{me} rechute et 40° pendant la 3^{me} rechute), présente un sang qui, dès le premier jour, après la crise, n'a qu'un pouvoir spirillicide très faible (les spirilles vivent pen-

dant 24 heures à la température de 36°,5, et 47 heures à la température ordinaire).

Chez le malade B (tableau I), les spirilles vécurent pendant 18-22 heures dans les mêmes conditions, mais sans qu'on ait ajouté de sérum spirillicide.

Il est donc tout à fait impossible de voir, dans cette expérience, une relation entre la crise et le pouvoir spirillicide.

L'expérience faite avec le sang apyrétique du 2^{me} jour chez les mêmes malades permet de conclure à une augmentation très prononcée du pouvoir spirillicide. Ceci est évidemment tout à fait en désaccord avec le passage des produits spirillicides dans le sang pendant la crise (tableau II, 7 et 28), car il devrait y en avoir plus le premier jour que le second.

Ainsi ce pouvoir spirillicide paraît être non pas la cause, mais plutôt la suite de la crise.

L'influence réciproque de deux sérums mélangés doit aussi jouer un certain rôle. Ainsi le même sérum (C), mélangé avec le sang d'un autre malade, sang contenant des spirilles, n'avait qu'un pouvoir spirillicide très faible (23 heures à 36°,5).

Nous ne pouvons expliquer ce fait par une différence dans l'état des spirilles, car, dans les deux cas, on avait employé le sang du 3^{me} jour du 2^{me} accès.

Dans l'expérience D (tableau II du 6/IV), les spirilles meurent après 9 heures dans le sang apyrétique du *premier* jour après le 2^{me} accès. Si on les introduit dans le sang du même malade pris le *second* jour, ils n'y restent vivants que 5 heures; on observe donc, dans ce cas, non pas une diminution du pouvoir spirillicide comme on aurait pu le croire, mais, au contraire, un accroissement de ce pouvoir.

Les spirilles moururent après 6 heures dans le sang apyrétique du même malade (V), sang pris le premier jour après la crise du 3^{me} et dernier accès. Si le pouvoir spirillicide du sang était en relation avec l'acquisition de l'immunité, il faudrait s'attendre à une augmentation de ce pouvoir après le 3^{me} accès; nous avons vu par contre qu'il était moindre que le 2^{me} jour après le second accès, et qu'il avait diminué presque du double après le 3^{me} accès. L'expérience (J) prouve que l'immunité acquise n'est pas en relation de cause avec la mort plus ou moins prompte des spirilles *in vitro* dans le sang apyrétique. Ainsi les spirilles mou-

raient après seulement 36 heures pendant le 10^e jour de l'apyrexie après le 2^e et dernier accès, tandis que l'immunité était déjà élaborée par l'organisme après ce 2^e accès, puisqu'il n'y en a pas eu de 3^e.

Dans cette expérience, on voit aussi que le mélange des deux sérums (le sérum apyrétique et le sérum contenant les spirilles) joue un certain rôle : ainsi les spirilles mouraient après 20 heures dans le sang de ce même malade (exp. I, 9/IV) le 3^e jour de l'apyrexie, tandis que, le 19^e jour, ils mouraient après 10 h. (les variations s'expliquent probablement, non pas par le pouvoir spirillicide seul, mais aussi par l'influence réciproque des sérums).

Dans l'expérience G (5/IV) nous observons de nouveau la mort rapide des spirilles au bout de deux heures.

Si on admet que les spirilles pris le 6^e jour du 1^{er} accès (chez C) meurent si rapidement parce qu'ils sont déjà affaiblis, — nous devons exclure cette supposition dans l'expérience suivante du 6/IV, faite avec le sang apyrétique du même malade (pris le second jour du 2^e accès qui avait duré encore 3 jours) et mélangé avec du sang contenant des spirilles. Car ici aussi les spirilles meurent dans deux heures. Nous retrouverons ce même pouvoir spirillicide accentué dans l'expérience G 8/IV : le 4^e jour après la crise, les spirilles meurent dans 1 1/2 et le 6^e jour dans 2 heures. Néanmoins le malade eut une 2^e rechute le 3^e jour.

Par suite, s'il était permis de transporter les conclusions des observations faites *in vitro* sur ce qui a lieu dans l'organisme, il paraîtrait impossible d'expliquer pourquoi tout le sang spirillicide n'a pas pu tuer le petit nombre des spirilles ayant résisté dans l'organisme, et n'a pas pu empêcher le 2^e accès. Nous allons voir qu'on ne peut expliquer ce fait par une hypothèse des spores.

Le tableau ci-joint montre combien varient les résultats des observations dans chaque cas.

Pourtant nous devons indiquer que dans une grande partie des cas avant la crise ou bien les jours qui la suivent, — il se développe dans le sang (hors de l'organisme) des produits qui rendent le sérum spirillicide.

Cette propriété, que Gabritchewsky a indiquée le premier, n'est pas la cause de la crise, mais serait, à ce qu'il paraît, plutôt le résultat de celle-ci.

Les observations faites sur les singes ne donnent pas non plus d'indications sur les relations de causalité entre la crise, l'immunité acquise et la propriété spirillicide.

Ainsi les expériences 1, 2 et 3 (tab. III) prouvent que le sang du singe normal a une propriété spirillicide, tandis que d'après Gabritchewsky cette propriété ne serait que le résultat de la maladie supportée.

Il est bien plus naturel de supposer que le mélange de deux sérums produit une substance toxique pour les spirilles.

L'expérience 3 démontre que le sérum d'un singe normal et celui d'un singe malade, pris 12 heures après la crise, ne diffèrent presque pas par rapport à leurs propriétés spirillicides. Le premier tue les spirilles après 19 heures, le second après 18, tandis que, sans ces sérums, les spirilles vivent pendant 30 heures.

Dans l'expérience 4, on mélangeait chaque jour, pendant toute la durée de la maladie, le sérum IV pris 4 heures après la crise avec les spirilles du singe VIII.

Pendant quatre jours la propriété spirillicide oscillait entre 15 et 20 heures; on aurait pu s'attendre à ce que le pouvoir spirillicide augmentât à mesure de l'affaiblissement des spirilles. Sans l'addition du sérum, les spirilles vivaient de 23 à 29 heures.

Dans l'expérience 3, les spirilles furent détruits par ce même sérum après 24 h. tandis que, dans le sang du singe qui avait fourni ce sérum, les spirilles ne vécurent que pendant 2 heures.

Les données du tableau III ne plaident pas en faveur d'un pouvoir spirillicide prononcé chez les singes. Pourtant, il devrait être plus accusé que chez l'homme, car les singes ne prennent pas la maladie dans les conditions naturelles; ils n'ont pas de rechutes dans la grande majorité des cas, et leur maladie est d'une durée bien plus courte que chez l'homme.

L'addition de sang apyrétique provoque presque toujours les modifications suivantes: les spirilles, d'habitude extrêmement mobiles, perdent de plus en plus leur mobilité. Ils se rassemblent en groupements caractéristiques étoilés, dans lesquels chaque spirille conserve nettement sa structure.

Avant de mourir, les spirilles deviennent de plus en plus immobiles, et on les voit se raidir en conservant pourtant leur forme spirale.

Quelques-uns ont l'aspect presque bacilliforme. Ces spirilles

prennent bien les colorations habituelles, même seulement après un long contact avec le sérum apyrétique. On n'en rencontre point de déformés, de granuleux ou de renflés, ni parmi les vivants, ni sur les préparations colorées. Ils meurent en grande majorité tels quels. Je pense que les rares formes renflées et granuleuses qu'on trouve sur quelques préparations doivent être considérées comme des modifications post-mortelles.

Ainsi, en observant dans une goutte suspendue des spirilles dont la mobilité commence à diminuer, on voit que d'abord les mouvements en tourne-vis se transforment en mouvements onduleux, les spirilles se plient en deux et ne restent mobiles qu'à un bout, leurs balancements deviennent de plus en plus faibles, et enfin les spirilles s'étendent et s'immobilisent.

Ce n'est qu'après un certain temps ($1/4$, $1/2$ heure), qu'on observe dans quelques-uns d'eux un certain renflement du milieu et des granulations; la majorité des spirilles morts disparaît au contraire sans se modifier, comme dissoute.

Les spirilles granuleux se colorent difficilement.

Je n'ai jamais pu observer de vraie agglutination dans toute la durée de mon travail.

La comparaison des modifications subites par les spirilles dans une goutte de sang d'un homme malade, ou dans celui d'un singe inoculé, prouve qu'il n'y a qu'une différence de temps dans la disparition des spirilles du sérum spirillicide.

Je passe aux expériences sur les singes.

M. Gabritchewsky admet la possibilité de l'existence de spores ou d'un état de résistance chez les spirilles, à l'aide desquels ils échappent à l'action du sérum spirillicide. De ces spores se développeraient les spirilles, en donnant ainsi lieu à la rechute.

Ainsi que l'a dit Metchnikoff, même en acceptant cette hypothèse, il serait tout à fait incompréhensible comment les spirilles développés pendant l'incubation du 2^e ou 3^e accès auraient pu échapper à la destruction, lorsque en ce moment le pouvoir spirillicide du sang est encore très élevé. Gabritchewsky émet la supposition que les spirilles passent dans la rate et y sont digérés par les polynucléaires. Les spirilles seraient déjà affaiblis à ce moment par l'action des substances spirillicides abondamment réparties dans la circulation pendant la crise. Par contre, les expériences de Metchnikoff prouvent que la rate des singes

(au moment de la crise) contient des spirilles virulents, capables de provoquer la maladie chez un autre singe si on les lui inocule.

Vu l'importance de cette observation fondamentale, j'ai fait l'expérience suivante :

Le 2/IV j'inoculai à un singe (*Macacus nemestrinus* I) du sang de rate contenant des spirilles. Le 5/IV, le sang du singe inoculé contenait des spirilles en petit nombre; le 6/IV la température atteignit vers le soir 41°,2, et le sang contenait encore des spirilles; pendant les oscillations ultérieures de la température, le nombre des spirilles diminuait toutes les demi-heures, il y avait des champs visuels entiers sur lesquels on n'en trouvait point; les spirilles isolés qu'on pouvait encore observer se coloraient normalement et ne présentaient aucuns signes de dégénérescence. Le singe fut tué le 6/IV par du chloroforme. A ce moment, la température était de 40°,8 et son sang contenait très peu de spirilles. Sa rate fut aussitôt broyée dans du bouillon, et cette émulsion divisée en deux parties. L'une d'elles fut inoculée à un singe (II *Cercopithecus griseoviridis*). Le 10/IV la température atteignit 39°,5. L'accès dura pendant 48 heures, il était tout à fait caractéristique et le sang contenait des spirilles pendant toute sa durée.

Cette expérience prouve donc que vers la fin de l'accès, quand il n'y a presque plus de spirilles dans le sang, ils se rassemblent dans la rate en conservant complètement leur vitalité et leur virulence. Il ne peut donc être question d'un affaiblissement des spirilles dans la rate. Il est très facile de se convaincre qu'ils sont réellement englobés par les phagocytes. Une simple coloration par le violet de gentiane montre les polynucléaires complètement bourrés de spirilles, ainsi que l'avaient antérieurement décrit Metchnikoff et Soudakewich.

L'examen le plus minutieux des préparations de la rate n'y révèle point la présence de spirilles libres. Donc les phagocytes polynucléaires de la rate englobent tous les spirilles vers la fin de l'accès, et tandis qu'on en trouve quelques-uns, isolés et libres dans le sang, on n'en rencontre plus dans la rate de non englobés. Malgré cela, ils y sont vivants et virulents encore pendant des heures.

L'autre partie de la même émulsion de la rate a servi à une seconde expérience.

S'il y a réellement des spores ou des formes résistantes des spirilles, on pourrait admettre qu'à la suite de conditions défavorables dans le sang, il s'en forme dans la rate. On sait que les spores supportent un chauffage d'une 1/2 heure à 60°. Donc le reste de l'émulsion de la rate fut chauffé pendant une demi-heure à 60° et inoculé à un singe (III, *Macacus griseoviridis*). Il fut observé depuis le 6/IV jusqu'au 18/IV. Son sang ne contenait pas de spirilles et sa température ne s'éleva pas même jusqu'à 39°. On examinait le sang chaque jour, toutes les 2 à 3 heures. Cette expérience prouve que du moins vers le commencement de la crise, il n'existe pas d'état plus résistant que le spirille lui-même. Mais, peut-être, les spores se forment-elles plus tard, pendant les premières heures après la crise?

Afin d'élucider cette question, un singe (IV, *Macacus rhesus*) fut inoculé le 8/IV avec du sang pris chez le singe du 6/IV le soir. Le 11/IV on trouva dans son sang des spirilles et l'accès dura jusqu'au matin du 13/IV. 4 heures après la constatation de la disparition des spirilles, le singe fut tué par le chloroforme, sa température était normale (38°, 2). Une émulsion fut faite avec la rate et on en inocula 2 c. c. à un singe (V, *Cercop. griseoviridis*). Le 17/IV, il eut un accès typique de fièvre récurrente qui dura pendant 48 heures. Son sang contenait des spirilles.

Ainsi, 4 heures après la disparition complète des spirilles du sang, — la rate contient des spirilles vivants et virulents puisqu'ils provoquent la maladie.

En admettant que c'est le pouvoir spirillicide qui est cause de la crise, on ne s'expliquerait pas son impuissance à tuer des spirilles déjà affaiblis et englobés par les cellules.

Sur des préparations colorées on constate l'absence complète de spirilles libres; ils sont tous englobés par les polynucléaires dont quelques-uns en sont complètement remplis.

Si les formes de résistance ne se sont pas produites au commencement de la crise, peut-être ont-elles pu se former les premières heures après la crise?

Pour le savoir, nous avons chauffé le reste de l'émulsion à 58-59° pendant une demi-heure et nous en avons injecté 2 c. c. à un singe (VI, *Cercopit. griseoviridis*). On observa ce singe jusqu'au 25/IV sans avoir pu constater de fièvre récurrente.

L'examen journalier et répété du sang ne démontra pas la

présence de spirilles. Ainsi cette expérience parle aussi contre l'existence des spores.

La 3^e expérience fut faite afin de chercher si la rate contenait encore, 12 heures après la crise, des spirilles ou des spores vivantes et virulentes.

Le singe II (*Cercopit. griseoviridis*) fut tué le 12/IV, 12 heures après la constatation de la disparition de ses spirilles. Soudakévitch indique dans une de ses expériences que déjà 10 heures après la crise, il ne réussissait pas à démontrer d'une façon absolue la trace des spirilles dans les phagocytes de la rate.

La coloration habituelle des préparations étalées ne nous permit pas non plus de constater de traces précises des spirilles.

Mais on pouvait supposer que s'il restait quelques spirilles vivants ou bien leurs formes résistantes, — on pourrait le démontrer par une inoculation qui, dans ce cas, devrait au moins provoquer un faible accès.

Dans le but d'élucider cette question, nous inoculâmes le 12/IV à un singe (VII, *Macacus nemex*), 2 c. c. d'une épaisse émulsion de la rate. Le singe inoculé fut observé pendant 12 jours sans présenter aucun signe morbide. Les examens multiples et journaliers du sang ne dévoilèrent pas la présence de spirilles. Ainsi, 12 heures après la crise, on ne peut démontrer non plus par inoculation la présence de spirilles ou des formes résistantes supposées.

D'accord avec la plupart des auteurs antérieurs, l'examen des préparations colorées du foie, de la moelle des os, des glandes lymphatiques, des poumons, des reins, — démontra l'absence complète de spirilles dans tous ces organes. Nous n'avons pas de raison d'y supposer la présence de spores, puisque les spirilles y sont absents : d'autant plus que nous n'avions pas trouvé de spores dans la rate au début de la crise, moment de la plus grande accumulation des spirilles dans cet organe.

Nous pouvons tirer la conclusion suivante de cette série d'expériences : pendant la crise et les premières heures après, la rate contient dans ses cellules polynucléaires des spirilles vivants, non affaiblis et virulents. Elle ne contient pas de spores, même plus tard, après 12 heures.

Le pouvoir spirillicide du sang ne peut servir d'explication à la crise dans la fièvre récurrente.

Passons à une autre série d'expériences, et notamment à l'injection de carmin et de charbon de bois pulvérisés dans le sang du singe, injection suivie par l'inoculation des spirilles.

Ponfick a démontré que des particules de poudre de charbon introduites dans la circulation s'amassent dans les cellules amiboïdes du foie, de la rate et de la moelle des os. Un envahissement considérable du sang par ces particules est suivi d'un aussi fort englobement par les phagocytes sanguins. L'animal inoculé par des microbes après que ses phagocytes ont englobé les particules charbonneuses, devient plus sensible ou bien perd son insensibilité contre l'infection. Si la quantité de poudre charbonneuse introduite est grande, l'animal peut même succomber (p. ex. dans mes expériences avec le charbon inoculé à un chien auquel j'avais injecté de la poudre de charbon).

Puisque ce sont les phagocytes polynucléaires de la rate qui jouent à eux seuls le rôle dans la crise de la fièvre récurrente, et que ce sont ces mêmes cellules qui englobent les particules pulvérisées et insolubles introduites dans l'organisme, il était permis de supposer que les singes, infectés après avoir été inoculés avec de la poudre de carmin ou de charbon, réagiraient contre l'infection différemment des singes normaux.

Donc, le 11/IV on injecta dans la veine crurale d'un singe (VIII, *Macacus rhesus*), près de 150 c. c. de poudre de carmin en suspension dans une solution de NaCl à 0,6 0/0. La peau fut recousue et guérie par première intention. En même temps, le singe fut inoculé par le sang d'un autre singe, sang contenant des spirilles (2^e jour de l'accès). Le quatrième jour, 14/IV, vers le soir, on constata l'apparition de spirilles chez le singe inoculé; ils persistèrent jusqu'à la fin du 18/IV, en quantité assez restreinte : leur forme et leurs mouvements étaient normaux.

Le 19/IV, ils disparurent. La quantité des spirilles pendant les deux derniers jours était ce qu'elle est habituellement pendant les dernières heures qui précèdent la crise.

On ne put observer d'élévation de température avant la crise, malgré des observations faites chaque demi-heure. L'abaissement de la température et la disparition des spirilles avaient plutôt un caractère lytique.

Généralement les singes supportent bien la fièvre récurrente ; ce n'est que dans les dernières heures de l'accès, et surtout avant

l'élévation de température qui précède la crise, qu'ils sont très abattus, ne mangent pas, se blottissent dans un coin et boivent avec avidité.

Par contre, le singe ayant reçu la poudre de carmin était très faible et abattu pendant toute sa maladie; il avait beaucoup maigri après la chute définitive de la température, et se rétablissait très lentement.

Je ne me permets pas de tirer des conclusions de cette expérience, car j'ai remarqué, le lendemain de l'expérience, que les téguments cutanés du singe avaient pris une teinte rose rougeâtre; l'urine avait la même teinte, et le singe était abattu encore avant le début de la maladie.

Evidemment, une partie du carmin s'était dissoute, circulait dans l'organisme, et s'éliminait par l'urine. Ce n'était donc pas un dépôt de carmin non dissous qui avait lieu dans ce cas, mais bien une solution carminée qui circulait dans l'organisme. Nous pouvons toutefois signaler que la maladie dura notablement plus longtemps dans l'organisme affaibli.

La première expérience d'injection de charbon pulvérisé ne réussit pas, car le singe succomba à une embolie d'une branche de l'artère pulmonaire. Par suite, dans les expériences suivantes, j'employais de la suie, soigneusement lavée consécutivement dans de l'éther, de l'alcool et de l'eau.

Le 18/IV, on injecta à un singe (le n° III,) qui avait été antérieurement inoculé avec une émulsion de rate, chauffée à 60°, et n'avait pas pris la maladie) près de 150 c. c. d'une solution de NaCl à 0,6 0/0, contenant une suspension épaisse de la suie.

L'injection fut faite dans la veine de la jambe et la peau incisée fut recousue. La plaie guérit par première intention.

Le 22/IV, la température monta à 40°,4; des spirilles apparurent dans le sang et y persistèrent pendant cinq jours, même à la température de 38°,2. Les derniers deux jours (25-26/IV), on observait peu de spirilles dans le sang, leurs mouvements étaient aussi vifs que d'habitude, et colorés ils avaient leur aspect caractéristique.

Il est à signaler que l'accès n'avait pas son caractère usuel: ainsi nous n'avons pas pu observer de crise, et la température baissa graduellement pendant deux jours au lieu de quelques heures. Bien que la température fût ultérieurement (le 1/V)

élevée jusqu'à 39°,1, on n'observait plus de spirilles. Cette élévation était due sans doute à la présence d'un foyer tuberculeux du poumon droit qui fut trouvé à l'autopsie. Le singe mourut le 3/V.

Il avait un échinocoque multilobulé du foie et des échinocoques nombreux du péritoine. Les phagocytes de la moelle des os, du foie, des poumons et de la rate contenaient de la poudre de charbon.

Malheureusement, cette expérience ne peut pas être regardée comme probante, par suite des données de l'autopsie, tuberculose et échinocoques.

Il faut toutefois signaler la marche anormalement lente de l'accès et sa terminaison lytique.

Le 25/IV, une expérience analogue fut répétée avec un autre singe (X, *Cercopithec. gr. vir.*) On lui injecte dans la veine de la jambe 120 c. c. de suie en suspension dans une solution de NaCl à 0,6 0/0, et en même temps on lui inocule le sang du singe précédent (IX). Le 5^e jour (29/IV), le singe inoculé prit la fièvre récurrente : l'accès dura 4 jours et se termina par une crise (la nuit du 3/V). L'injection de la suie avait donc prolongé l'accès sans modifier son cours habituel.

En résumant ces expériences peu nombreuses, nous pouvons néanmoins conclure que les causes qui altèrent la nutrition cellulaire amènent en même temps la prolongation de la maladie (expérience avec le carmin) et en partie une modification dans son cours. L'introduction de corps étrangers dans les cellules ne supprime pas leur réaction phagocytaire, mais la ralentit plus ou moins ; et l'accès, au lieu de se terminer par une crise, peut se terminer par une lyse.

Le manque de singes ne me permit de faire qu'une seule expérience de traitement de la fièvre récurrente.

Un *Macacus rhesus* (XI) fut inoculé le 10/IV avec du sang d'un singe contenant des spirilles.

Le 14/IV, la température du singe inoculé s'éleva à 39°,6 et des spirilles apparurent dans son sang.

On injecta alors à ce singe 6 c. c. de sérum puisé la veille chez le singe malade, 4 heures après la chute de sa température. Le soir du 14/IV, on observait encore des spirilles ; mais le lendemain matin (15/IV), ils disparurent, la température baissa et

resta normale jusqu'au 21/IV, quand elle s'éleva brusquement jusqu'à 40°. L'examen du sang, à mon extrême étonnement, démontra la présence de spirilles. Ils y persistèrent jusqu'au soir du 22/IV, c'est-à-dire pendant 36 heures, jusqu'à la chute de la température.

En ce qui concerne le cas exposé, on pourrait supposer ou bien une rechute normale, très rare chez les singes¹, ou bien faudrait admettre que le sérum thérapeutique activa les phagocytes à englober les spirilles, mais qu'ils ne furent pas tous digérés, qu'ils se dégagèrent et provoquèrent une rechute. Si, d'après Gabritchewsky et Ivanoff, on admet l'effet thérapeutique du sérum, il faut accepter la seconde explication.

Alors la brièveté du premier accès et ses températures comparativement basses seraient dues à l'action thérapeutique du sérum ; la rechute serait due à l'action trop faible du sérum, qui n'aurait conféré qu'une immunité très passagère, ainsi que cela a été observé dans d'autres maladies.

CONCLUSIONS

1. Le sang des hommes et des singes ayant supporté la fièvre récurrente présente, dans la majorité des cas, des propriétés spirillicides.

2. Ces propriétés ne sont pas en relation de cause avec la crise, mais elles en résultent plutôt.

3. Le pouvoir spirillicide est dû en partie à l'action réciproque des deux sérums mélangés.

4. Les cellules polynucléaires de la rate contiennent pendant la crise, et quelques heures après, des spirilles vivants et dont la virulence n'est pas atténuée.

5. Les expériences sur les singes prouvent que les spirilles n'ont pas de spores ni pendant ni après la crise.

6. La marche et l'aspect de la maladie sont essentiellement modifiés par l'injection intraveineuse de substances en suspension, injection préalable à l'inoculation du virus.

L'exposé préliminaire de ce travail a été fait au XII^e congrès international à Moscou. M. Gabritchewsky, en l'analysant dans

1. Carter n'en observa que deux fois, et encore admit-il la possibilité d'une contagion par d'autres singes. Dernièrement, Gabritchewsky communiqua un cas de rechute dans ses expériences.

les *Archives russes de pathologie* (1898, t. IV) ¹ émet l'opinion que mes expériences faites *in vitro* ne peuvent servir de base à aucune conclusion.

Ce n'est pas parce que je regarde les observations *in vitro* comme concluantes en général que je les lis, mais parce que c'était la seule manière de vérifier celles de M. Gabritchewsky, faites par ce procédé.

M. Gabritchewsky dit plus loin que mes expériences avec l'inoculation de la pulpe de rate, chauffée à 60°, prouvent des choses qui n'ont été niées par personne.

C'est la supposition émise en 1896 par M. Gabritchewsky ² de l'existence de spores qui a provoqué mes expériences. Si les spores existaient, elles devraient se montrer plus résistantes que l'état végétatif aux diverses influences physiques, chimiques et biologiques. Si mes expériences avaient donné un résultat positif, elles auraient par cela confirmé la supposition de M. Gabritchewsky.

Le résultat négatif prouve, par contre, l'erreur de cette supposition.

Dans son mémoire sur les spirilles des oies, où M. Gabritchewsky abandonne sa théorie des spores, il en expose une autre, dans le but de concilier son hypothèse de la substance spirillicide du plasma sanguin avec les faits observés sur le vivant. Pour appuyer cette nouvelle explication, il cite le fait que la propriété spirillicide du sang est supérieure à celle de l'émulsion des organes.

Mais comme les spirilles vivent dans le sang et la lymphe, et non pas dans les cellules des organes, la comparaison du pouvoir spirillicide du sang avec celui des organes broyés ne présente aucune valeur pour la solution du problème posé. Ceci nous dispense de critiquer avec plus de détails une théorie inventée pour remplacer l'hypothèse de la formation des germes résistants dans l'organisme débarrassé des spirilles.

1. V. aussi *Centralblatt für Bacteriologie* 1898.

2. Ces *Annales* 1896, p. 633 et 637.

TABLEAU I

A. 24/III. T. 40°,0 — 2 ^e jour de la 3 ^e rechute.		A la température de la chambre. 60	Dans l'organisme. 40
Survie des spirilles à 36°,5. 28 h.			
25/III. 40°,4 — 3 ^e jour de la 3 ^e rechute.	18	22	16
B. 23/III. — K. 1 ^{er} jour du 2 ^e accès.	17		108
24/III. 39°,3 — 2 ^e jour du 2 ^e accès.	27	89	84
+ Mon sang.....	21	52	
(J'ai eu la fièvre récur- rente il y a 19 ans).			
+ A.....	25	86	
25/III. 40°,1 — 3 ^e jour 2 ^e accès.	48	91	60
Mon sang.....	18	57	
A.....	26	95	
26/III. 39°,9 — 4 ^e jour 2 ^e accès.	45	73	36
Mon sang.....	22	60	
A.....	25	63	
C. 9/X. I. 39°,8 — 2 ^e jour 1 ^{er} accès.	21	112	108
+ Sang de K.....	10	95	
+ F.....	23	84	
M.....	12	118	
+ O.....	10	62	
(Fièvre récurrente il y a quatre mois.)			
D. 22/X. P. 32°,1 — 3 ^e jour 3 ^e accès.	27	92	5
+ K.....	18	68	
+ F.....	12	84	
+ O.....	13	61	
E. 12/XI. G. 40°,1 — 1 ^{er} jour 2 ^e accès.	32	84	84
+ Mon sang.....	18	70	
+ K.....	15	86	
+ O.....	10	60	
F. 19/XI. G. 39°,8 — 2 ^e jour 2 ^e accès.	31	112	60
+ Mon sang.....	19	101	
+ Ayant eu la fièvre ré- currente.....	21	46	

TABLEAU II

SURVIE DES SPIRILLES

1^{er} jour de l'apyrexie après le 3^e accès à 36,5 d 16,20°

Sérum C + spirilles O..... 24 47

A. 2^e jour de l'apyrexie.

— C + spirilles Ch..... 23 48

— C + spirilles O..... 7 28

3^e jour de l'apyrexie.

— C + spirilles O..... 8 24

B. 1^{er} jour de l'apyrexie après le 3^e accès.

Sérum A + spirilles D..... 2 12

C. 1^{er} jour de l'apyrexie après le 4^e accès.

Sérum C + spirilles U..... 5 48

D. 1^{er} jour de l'apyrexie après le 2^e accès.

Sérum K + spirilles V..... 9 8

2^e jour de l'apyrexie après le 2^e accès.

— K + spirilles D..... 5 47

E. 3^e jour de l'apyrexie après le 3^e accès.

Sérum A + spirilles C..... 5 26

4^e jour »..... 7 26

5^e jour »..... 7 30

F. 7^e jour de l'apyrexie après le 2^e et dernier accès.

Sérum O + spirilles Cm..... 1 1/2 8

8^e jour »..... 4 8

G. 1^{er} jour de l'apyrexie après le 1^{er} accès.

Sérum R + spirilles Cyt..... 2 16

2^e jour » + spirilles Bur..... 2 5

4^e jour » + spirilles P..... 1 1/2 28

6^e jour » + spirilles P..... 1 20

H. 8^e jour de l'apyrexie après le 2^e et dernier accès.

Sérum Chm + spir. Cm..... 1 3/4 6

9^e jour Chm + spir. Cm..... 2 4

I. 10^e jour après le 2^e et dernier accès.

Sérum Kap. + spir. P..... 36 80

13^e jour Kap. + spir. I..... 20 28

19^e jour Kap. + spir. Rep..... 10 44

K. 1^{er} jour après le 3^e accès.

Sérum Kap. + spir. T..... 6 31

2^e jour Kap. + spir. F..... 10 39

TABLEAU III

Macacus nemest. I.

1. 6 IV. T 40° 8.	Survie des spirilles		Dans l'organisme.
	à 36,5	à 16-20°	
+ Le sérum d'un cerco- pith. gris viridis nor- mal.	57	96	Le singe est tué au début de la crise.
+ Le sérum du Macacus Rhes. normal.	35	80	
+ Le sérum du Macacus nemest. normal.	23	95	

Cercopithecus griseo-viridis II.

2. 2/IV. 40°,6.	40	63	6
+ Le sérum du Cercop. gris.-viridis normal.	29	58	6

Macacus Rhesus IV.

3. 12/IV. 40°,0.	30	81	26
+ Sérum de II 12 heures après la crise.	18	40	26
+ Le sang d'un macacus normal.	19	54	26
13/IV. 49°,9	28	75	2
+ Le sérum du même singe 4 h. apr. la crise.	21	43	2

Macacus Rhesus VIII.

4. 15/IV. 40,4°.	29	57	72
+ Le sérum du IV.....	47	36	72
16/IV. 40,9°.....	26	63	60
+ Le sérum du IV.....	18	40	60
17/IV. 40,7°.	23	48	36-40
+ Le sérum du IV.....	15	46	36-40
18/IV matin. 39,8°.....	28	67	12-16
18/IV soir. 39,0.	16	48	36-40
+ Sang du III.....	28	64	moins de 12 h.
+ Sérum du IV.....	20	49	—
+ Sérum du III.....	18	54	—

Macacus nemestrinus IX.

5. 22/IV. 40,1°.	36	80	108
+ Sérum V, 42 h. après la crise.....	23	53	108
23/IV. 40,0°.....	30	78	84
Sérum V.....	24	48	84
24/IV. 39,6°.....	22	82	60
+ Sérum V.....	20	40	

Cercopithecus griseo-viridis X.

	Survie des spirilles		Dans l'organisme.
	à 36,5	à 16-20°	
6. 29/IV. 40,1°.	39	92	84
+ Le sérum du IX 12 h. après la disparition des spirilles.....	48	63	
30/IV. 39,6°.....	25	90	60
+ Le sérum IX 2 h. après la disparition des spirilles.....	16	45	
39,5°.....	30	83	36
+ Sérum IX 36 heures après la crise.....	17	63	

I. *Macacus nemestrinus*.

2/IV....	38,1	37,9
3/IV....	37,6	38,1
4/IV....	38,2	38,6
5/IV....	39,0	40,5 spirilles.
6/IV....	40,8	41,2 40,8 sacrifié.

II. *Cercopithec. griseo-viridis*.

Inoculé avec 2 c. c. d'une émulsion de la pulpe de rate au moment du début de la crise.

6/IV....	37,6	38,2
7.....	38,1	38,4
8.....	38,1	38,5
9.....	38,4	38,3
10.....	39,5	40,1 spiril. à 12 h. 1/2.
11.....	40,1	40,6 40,0 39,7
12.....	38,1	sacrifié à 12 h. après la disparition des spirilles.

III. *Macacus nemest.*

Inoculé de 2 c. c. d'une émulsion de la pulpe de rate, chauffée à 60°.

6/IV.....	38,5	38,4
7.....	37,6	38,1
8.....	38,2	38,5
9.....	38,0	38,5
10.....	37,9	38,4
11.....	37,8	38,5
12.....	37,8	38,4
13.....	37,9	38,5
14.....	38,0	38,4
15.....	37,5	38,4
16.....	38,4	38,2
17.....	38,0	38,5
18.....	38,1	38,5

IV. *Macacus Rhesus*.

8/IV....	37,6	38,2
9.....	37,0	38,4
10.....	38,0	38,4
11.....	39,6	39,5 spirilles.
12.....	40,0	40,6 spirilles.
13.....	40,9	40,7 40,0 spirilles
	12 h.	1 h.
	disparus.	38,1 38,0 38,1
	Sacrifié 4 h. après la disparition des spirilles.	

V. *Cercopithecus griseo-viridis*.

Inoculé d'une émulsion de la rate 4 heures après la crise.

13/IV....	38,2
14.....	38,1 37,9
15.....	37,8 38,4
16.....	38,1 37,8
17.....	38,9 39,4 spirilles.
18.....	39,9 40,1 spirilles.
19.....	38,0 37,4
20.....	38,5 38,2
21.....	37,8 37,5
22.....	37,6 37,4
23.....	37,6 38,1

VI. *Cercopithecus griseo-viridis*.

Inoculé 4 heures après la crise avec une émulsion de rate, chauffée à 58-59°.

13/IV.....	38,1
14.....	38,1 37,9
15.....	37,8 38,5
16.....	38,4 38,3
17.....	38,1 38,5
18.....	38,2 38,7
19.....	38,1 38,3
20.....	37,9 38,1
21.....	37,8 38,3
22.....	38,1 38,4
23.....	38,2 38,6
24.....	38,3 38,2
25.....	37,8 38,2
26.....	37,9 38,0

VII. *Macacus nemestr.*

Inoculé avec une émulsion de rate 12 heures après la crise.

12/IV.....	37,8	38,5
13.....	38,1	38,3
14.....	38,0	38,2
15.....	38,6	38,2
16.....	37,5	38,2
17.....	38,4	38,1
18.....	38,0	38,4
19.....	37,6	38,1
20.....	38,0	32,2
21.....	37,8	37,8
22.....	38,0	38,5
23.....	38,6	38,9
24.....	38,0	38,1

VIII. *Macacus Rhesus*.

Injection de carmin en suspension dans 150 c. c. de NaCl à 0,6 % et inoculation du virus de la fièvre récurrente.

11/IV.....	37,8	38,9	
12.....	38,6	39,1	
13.....	38,0	38,8	
14.....	39,1	39,2	spirilles.
15.....	39,5	40,4	—
16.....	40,9	38,9	—
17.....	40,7	39,6	—
18.....	39,8	39,0	—
19.....	38,5	38,2	
20.....	37,9	39,0	
21.....	38,2	38,8	
22.....	38,1	39,2	
23.....	37,7	38,1	
24.....	37,6	37,8	
25.....	37,8	37,8	
26.....	37,6	38,0	
27.....	38,1	38,0	

IX. *Macacus Nemestr*.

Injection de 150 c. c. de suie en suspension et inoculation du virus de la fièvre récurrente en même temps.

18/IV.....	38,1	38,5	
19.....	38,0	38,5	
20.....	38,4	38,1	
21.....	38,1	38,2	
22.....	40,1	40,4	spirilles.
23.....	40,0	40,8	—
24.....	39,0	40,0	—
25.....	38,8	39,2	—
26.....	38,5	38,2	—
27.....	38,0	37,5	
28.....	37,6	38,8	
29.....	37,8	37,5	
30.....	37,3	38,6	
1/V.....	39,1	39,0	
2.....	38,0	37,6	
3.....	37,4	38,0	
4.....	37,4	38,0	
5.....	37,8	38,2	
6.....	37,6	38,0	
7.....	37,0	36,9	
8.....			

X. *Cercopithecus griseo-viridis*.

Injection de 120 c. c. à peu près de suie en suspension et inoculation en même temps du virus de la fièvre récurrente.

25/IV.....	38,1	38,4	
26.....	38,0	37,9	
27.....	37,6	38,2	
28.....	38,3	38,0	
29.....	40,1	41,0	spirilles.
30.....	39,6	39,0	—
1/V.....	39,5	39,4	—
2.....	39,6	40,0	—
3.....	37,0	38,1	
4.....	37,2	38,0	
5.....	37,0	38,1	
6.....	37,2	37,8	
7.....	37,8	38,5	
8.....	37,6	38,4	
9.....	38,3	38,4	
10.....	38,2	38,5	
11.....	37,8	37,6	

XI. *Macacus Nemestr. traité*.

10/IV.....	38,1	38,5	
11.....	38,1	38,4	
12.....	37,8	38,6	
13.....	38,1	37,9	
14.....	39,6	39,2	spirilles.
15.....	38,2	37,5	
16.....	38,6	38,1	
17.....	37,6	38,0	
18.....	38,0	38,5	
19.....	38,0	38,4	
20.....	37,5	37,8	
21.....	40,0	39,8	spirilles.
22.....	40,2	38,4	—
23.....	37,6	37,2	
24.....	38,0	38,1	
25.....	38,2	38,5	
26.....	37,8	38,0	
27.....	38,1	38,2	
28.....	38,2	38,3	
29.....	38,4	38,1	
30.....	38,2	38,0	

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.